

Genetische Modulation der ABA-vermittelten Stressantwort in der Gattung Populus

**Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n**

**von Jennifer Popko
aus Peine**

1. Referent: Privatdozent Dr. Robert Hänsch

2. Referent: Professor Dr. Jörg Fromm

eingereicht am: 09.12.2009

mündliche Prüfung (Disputation) am: 05.02.2010

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin/den Mentor* der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Popko, J.; Hänsch, R.; Mendel, R.R.; Polle, A.; Teichmann, T.; The Role of Absciscic Acid and Auxin in the Response of Poplar to Abiotic Stress, Plant Biology (*in press*)

Tagungsbeiträge

Popko, J.; Oelkers, M.; Kuchernig, J.; Meyer, S.; Mendel, R.R.; Hänsch R.; "RNAi-Technology in Poplar". Poster Präsentation: Botanikertagung 2007, Hamburg

Mendel, R.R.; Popko, J.; Hänsch, R.; "The role of molybdoenzymes for poplar ABA metabolism". Vortrag: 2nd Poplar Symposium 2009, Göttingen

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS.....	I
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
III.	TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
IV.	ABKÜRZUNGEN	VIII
1.0	EINLEITUNG	1
1.1	Pappel als Modellorganismus.....	1
1.2	Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA).....	3
1.3	Die ABA-Biosynthese und Katabolismus	4
1.4	Das Spurenelement Molybdän und der Molybdäncofaktor	8
1.5	Die Molybdäncofaktor-Biosynthese	9
1.6	Die Molybdoenzyme	11
1.7	Die Moco-Sulfurase ABA3.....	13
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	14
2.0	ERGEBNISSE.....	15
2.1	<i>In-silico</i> -Analysen.....	15
2.2	Etablierung der AO und XDH <i>in-gel</i> -Aktivitätsfärbung bei <i>Populus</i>	20
2.3	Erzeugung und Charakterisierung transgener <i>P. x canescens</i>	21
2.3.1	AO-RNAi-Pflanzen.....	21
2.3.2	AAO3-Pflanzen	24
2.3.3	AO-Promoter:: <i>GUS</i>	27
2.3.4	ABA3-RNAi-Pflanzen.....	27
2.3.5	GFP/ABA3-Pflanzen	31
2.3.6	ABA3-Promoter:: <i>GUS</i>	34
2.3.7	Zusammenfassung der erzeugten <i>P. x canescens</i>	35
2.4	Allopurinol-Hemmung der <i>Populus</i> -XDH.....	36
2.5	Effekte von ABA-Applikation auf die transgenen Pappeln	39
2.6	Effekte von Salzstress auf die transgenen Pappeln	41
2.6.1	NaCl-Applikation für 66 und 44 Stunden	41
2.6.2	NaCl-Applikation für 16 Stunden	43

2.6.3	16- und 40-stündige NaCl-Applikation im Vergleich.....	48
2.6.4	NaCl-Induktion des ABA3-Promoters	50
2.7	Effekte von Trockenstress auf die transgenen Pappeln.....	51
2.7.1	Effekte von Trockenstress auf die AO- und XDH-Aktivität	55
2.7.2	Trockenstress-Induktion des ABA3-Promoters	59
2.8	Organspezifische Expression von ABA3	61
2.9	Microarray-Analysen.....	63
2.9.1	Transkriptuntersuchungen der ABA-Biosynthesegene	64
2.9.2	Transkriptuntersuchungen der ABA-vermittelten Signaltransduktion.....	64
2.10	Saisonaler Verlauf adulter Pappeln	65
2.10.1	ABA-Gehalte im saisonalen Verlauf	65
2.10.2	AO- und XDH-Aktivitäten im saisonalen Verlauf	68
3.0	DISKUSSION.....	69
3.1	<i>In-silico</i> -Analyse.....	70
3.2	Erzeugung und Charakterisierung transgener <i>P. x canescens</i>	72
3.3	Stressapplikationen	79
3.4	Saisonaler Verlauf der ABA-Biosynthese adulter Pappeln	91
3.5	Ausblick	93
4.0	ZUSAMMENFASSUNG	96
5.0	MATERIAL UND METHODEN	98
5.1	Material	98
5.1.1	Pflanzenmaterial	98
5.1.2	Chemikalien und Enzyme	98
5.1.3	Organismen-Stämme.....	99
5.1.4	Plasmide und Primer	99
5.1.5	Antikörper	101
5.2	Methoden	101
5.2.1	Arbeiten mit RNA	101
5.2.2	Methoden der DNA-Analyse.....	102
5.2.3	Klonierung der Konstrukte	111
5.2.4	Biochemische Methoden	112
5.2.5	Physiologische Untersuchungen	116

5.2.6	Anzucht von <i>P. x canescens</i>	119
5.2.7	Transformation von Pappel-Internodien	120
5.2.8	Stressapplikationen	121
6.0	LITERATURVERZEICHNIS	122
7.0	DANKSAGUNG	128
8.0	LEBENS LAUF	129

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Angiospermen-Phylogenie.....	2
Abb. 2:	Anzahl der wissenschaftlichen Veröffentlichungen	3
Abb. 3:	Schema der ABA-Biosynthese	5
Abb. 4:	Schema des ABA-Katabolismus.....	7
Abb. 5:	Struktur des eukaryotischen Molybdäncofaktors.	9
Abb. 6:	Biosynthese des Molybdäncofaktors	10
Abb. 7:	Domänenstruktur der pflanzlichen Molybdoenzyme	12
Abb. 8:	Finale Sulfurierung des Molybdäncofaktors	13
Abb. 9:	Domänenstruktur der PtAOs im Vergleich zur AAO1.....	16
Abb. 10:	Domänenstruktur der PtXDHs im Vergleich zur AXDH1.....	18
Abb. 11:	Domänenstruktur der PtABA3 im Vergleich zur AABA3.	18
Abb. 12:	Alignment der Proteinsequenzen der PtAO1 und PtAO2, sowie aller Arabidopsis AOs.....	19
Abb. 13:	AO- (A) und XDH-Aktivitätsfärbung (B) von unbehandeltem <i>P. x canescens</i> Wildtyp (WT) (1-3) und <i>A. thaliana</i> WT	20
Abb. 14:	PCR zum molekularen Nachweis der RNAi-Kassette in den transformierten AO-RNAi-Linien	22
Abb. 15:	Prozentuale Anteile der ABA-Gehalte der AO-RNAi-Pflanzen am Wildtyp	23
Abb. 16:	Molekulare Analyse der AO-RNAi-Pflanzen.....	23
Abb. 17:	PMMA-Abdrücke der AO-RNAi-Pflanzen.....	24
Abb. 18:	PCR-Analyse zum Nachweis des AAO3-Konstrukts.....	25
Abb. 19:	AO-Aktivität (A) und immunologischer Nachweis mit dem AAO1 Antikörper (B) verschiedener putativer AAO3-Pflanzen und des Wildtyps	25
Abb. 20:	<i>aao3</i> -Transkriptnachweis mittels RT-PCR	26
Abb. 21:	Erstellung des ABA3-RNAi-Konstrukts mittels Fusions-PCR	28
Abb. 22:	Molekulare Analyse der ABA3-RNAi-Pflanzen.....	29
Abb. 23:	ABA-Gehalte verschiedener ungestresster ABA3-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp	29
Abb. 24:	<i>aba3</i> -Transkriptnachweis in den ABA3-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp.....	30
Abb. 25:	PMMA-Abdrücke der ABA3-RNAi-Pflanzen.....	30
Abb. 26:	Molekulare Analyse der ABA3 überexprimierenden Pflanzen	32
Abb. 27:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP/ABA3 Nr. 6, 14b und 28.....	32
Abb. 28:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP/ABA3 Nr. 14b.....	33
Abb. 29:	ABA-Gehalte verschiedener unbehandelter GFP/ABA3-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp	33
Abb. 30:	PMMA-Abdrücke der GFP/ABA3-Pflanzen.....	34

Abb. 31:	GUS-Expression der ABA3::GUS-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp	35
Abb. 32:	PCR-Nachweis auf die Existenz des ABA3::GUS-Fragmentes	35
Abb. 33:	AO- (B) und XDH-Aktivitäten (C) der Allopurinol-Zugabe ins Medium (A).....	37
Abb. 34:	AO- (A) und XDH-Aktivitäten (B) des Allopurinol Erntezeitpunkts -1- ins Medium.....	38
Abb. 35:	XDH-Aktivität mit Allopurinol in der Färbelösung	38
Abb. 36:	ABA-Gehalt der Allopurinol-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle	39
Abb. 37:	AO- (A) und XDH-Aktivitäten (B) bei ABA-Applikation ins Medium	39
Abb. 38:	ABA3-Promoter – Veränderung der GUS-Expression durch ABA-Applikation.....	40
Abb. 39:	Auswirkungen der NaCl-Applikation auf die osmotische Stabilität der Wildtyp- Blätter.....	41
Abb. 40:	NaCl-Stress für 66 h.	42
Abb. 41:	ABA-Gehalte des NaCl-Stresses für 66 h.	42
Abb. 42:	NaCl-Stress für 44 h	43
Abb. 43:	NaCl-Stress für 16 h	44
Abb. 44:	ABA-Gehalte des NaCl-Stresses für 16 h	44
Abb. 45:	NaCl-Stress für 16 h	45
Abb. 46:	ABA-Gehalte des NaCl-Stresses für 16 h in ng pro FG	45
Abb. 47:	Öffnungsweite der Stomata im unbehandelten Zustand (dunkelblau) und nach 16 h 75 mM NaCl (gelb).....	46
Abb. 48:	PMMA-Abdrücke der Kontrolle im Vergleich zum Salzstress	47
Abb. 49:	Kurz- und langfristiger NaCl-Stress im Vergleich	49
Abb. 50:	ABA-Gehalte des kurz- und langfristigen NaCl-Stresses für 16 h und 40 h	49
Abb. 51:	ABA3-Promoter – Induktion durch NaCl.....	51
Abb. 52:	Wasserverlust über die Zeit von verschiedenen Versuchsansätzen.	52
Abb. 53:	RT-PCR der AO-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp	53
Abb. 54:	Öffnungsweite der Stomata im unbehandelten Zustand (dunkelblau), sowie nach 1 h (gelb) und 4 h Trockenstress (grün).	53
Abb. 55:	PMMA-Abdrücke der Kontrolle im Vergleich zum Trockenstress für 1 h und für 4 h	54
Abb. 56:	Verlust des Frischgewichts von 25 und 35% durch Trocknung.	56
Abb. 57:	ABA-Gehalt des 25% Frischgewichtsverlust durch Trocknung.....	56
Abb. 58:	Verlust des Frischgewichts von 20 und 40% durch Trocknung.	57
Abb. 59:	ABA-Gehalte des 20 und 40% Frischgewichtsverlust durch Trocknung	58
Abb. 60:	GUS-Aktivität [4-MU in pmol/mg 60 min] in ganzen Blättern der Pflanzen ABA3::GUS Nr. 8, 27, 50 und eines Wildtyps.	59
Abb. 61:	GUS-Aktivität [4-MU in pmol/mg 60 min] in den Blatthälften der Pflanzen ABA3::GUS Nr. 8, Nr. 50 und eines Wildtyps.....	60

Abb. 62:	GUS-Aktivität [4-MU in pmol/mg 60 min] in der Nervatur der Blattbasis der Pflanzen ABA3::GUS Nr. 8, 27, 50 und eines Wildtyps.	60
Abb. 63:	Histochemische GUS-Färbung bei Blattmaterial von ABA3::GUS Nr. 8 und einer Wildtyp-Pflanze.	61
Abb. 64:	Aktivitäten im ganzen Blatt (B) und der Blattnervatur (BN) im Vergleich.	62
Abb. 65:	ABA-Gehalt im ganzen Blatt und der Blattnervatur im Vergleich.	63
Abb. 66:	Schematische Darstellung der vergleichenden Proben	63
Abb. 67:	ABA-Gehalte der Blattknospen von <i>P. x canadensis</i> (A) und <i>P. deltoides</i> (B).	65
Abb. 68:	Jahresgang des ABA-Gehaltes [ng/g FG] von Rinde und Blättern in zwei verschiedenen Pappel Arten und Lufttemperatur.	67
Abb. 69:	AO- (A) und XDH-Aktivitäten (B) der Blätter im jahreszeitlichen Verlauf 2007 von <i>P. x canadensis</i>	68
Abb. 70:	Chemische Struktur des XDH-Hemmers Allopurinol (A) und der Substrate Hypoxanthin (B) und Xanthin (C).	79
Abb. 71:	Schema des letzten Biosyntheseschrittes durch die AO und den Shunt Pathway.	94
Abb. 72:	<i>attB1</i> und <i>attB2</i> -Sequenzen für die BP-Reaktion	107
Abb. 73:	Klonierungsstrategie der ABA3- und AO-RNAi-Fragmente in die RNAi-Kassette im pCK.	112

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Genomgrößen von Arabidopsis, Pinus und Populus im Vergleich	1
Tab. 2:	Genomische Datenbanken von Populus	2
Tab. 3:	Proteinidentitäten der vier AO-Isoformen aus <i>P. trichocarpa</i> mit denen aus <i>A. thaliana</i> und untereinander	16
Tab. 4:	Proteinidentitäten der vier AO-Isoformen aus <i>A. thaliana</i> untereinander	17
Tab. 5:	Proteinidentitäten der zwei XDH-Isoformen aus <i>P. trichocarpa</i> mit denen aus <i>A. thaliana</i> und untereinander	17
Tab. 6:	Proteinidentität von ABA3 aus <i>P. trichocarpa</i> und <i>A. thaliana</i>	18
Tab. 7:	Erzeugte transgene <i>P. x canescens</i>	36
Tab. 8:	Erhöhung des ABA-Gehaltes der Pflanzen aus Abb. 46 im Vergleich zur Kontrolle	46
Tab. 9:	Erhöhung des ABA-Gehaltes der Pflanzen aus Abb. 50 im Vergleich zur Kontrolle	50
Tab. 10:	Erhöhung des ABA-Gehaltes der Pflanzen aus Abb. 59 im Vergleich zur Kontrolle	58
Tab. 11:	GPS-Daten von <i>P. x canadensis</i> und <i>P. deltoides</i>	98
Tab. 12:	Überblick über die verwendeten Bakterienstämme	99
Tab. 13:	Auflistung der genutzten Plasmide	99
Tab. 14:	Liste der genutzten Primer und ihr Verwendungszweck	100
Tab. 15:	Eingesetzte Primer für cDNA-Analysen	105

IV. Abkürzungen

35S-Promoter	Cauliflower Mosaic Virus 35S	min	Minute
A	RNA-Promoter	Mo	Molybdän
<i>A. thaliana</i>	Adenin	Moco	Molybdäncofaktor
<i>A. th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MPT	Molybdopterin
AAO	<i>Arabidopsis thaliana</i>	mRNA	Boten Ribonucleinsäure (messenger RNA)
AB	Arabidopsis Aldehydoxidase	MU	Methylumbelliferon
ABA	Abcisin	MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
AABA3	Abcisin säure	MW	Morel und Wetmore
AAO	<i>Arabidopsis thaliana</i> ABA3	n	Nano
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
ABA-GE	Aldehydoxidase	NCED	Neun-Cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase
Abb.	ABA-Glycosylester	NR	Nitratreduktase
AK	Abbildung	NSY	Neoxanthin-Synthase
Amp	Antikörper	OD	Optische Dichte
AO	Ampicillin	<i>P.</i>	<i>Populus</i> (Pappel)
AP	Aldehydoxidase	PA	Phasein-säure
APS	Alkalische Phosphatase	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
AS	Ammoniumpersulfat	PCR	Polymerase Chain Reaction
ATP	Aminosäure	pers.	persönlich
AXDH	Adenosintri-phosphat	pSO	planzliche Sulfitoxidase
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PtABA3	<i>Populus trichocarpa</i> ABA3
BCIP	Xanthindehydrogease	PtAO	<i>Populus trichocarpa</i>
	4-Brom-4-Chloro-3-Indonyl-Phosphat-p-Toluidin-Salz		Aldehydoxidase
bp	Basenpaare	PtXDH	<i>Populus trichocarpa</i>
BSA	Rinderserumalbumin		Xanthindehydrogenase
bzw.	beziehungsweise	PVPP	Polyvinylpyrrolidon
°C	Grad Celsius	rev	reverse
CaM	Calmodulin	RNA	Ribonucleinsäure
cDNA	komplementäre DNA	RNAse	Ribonuclease
cLSM	confokales Laserscanningmikroskop	rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
CTAB	Cethyltrimethyl-ammoniumbromid	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Da	Dalton, Einheit der molekularen Masse	RT	Raumtemperatur
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
DNA	Desoxyribonucleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
DPA	Dihydrophaseinsäure	sec	Sekunde
DTT	Dithiothreitol	SL	Stammlösung
dNTP	Bezeichnung einer 1:1:1:1 Mischung der vier Nukleotide	SO	Sulfitoxidase
	Adenosin-, Guanosin-, Cytosin-, Thymidintri-phosphat, desoxy-Nucleosidtri-phosphat	Tab.	Tabelle
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TBS	tris buffered saline
EtBr	Ethidiumbromid	TCA	Trichloressigsäure
EST	expressed sequenced tag	TE	Tris-EDTA-Puffer
<i>et al.</i>	lat. et alii, dt. und andere	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamid
F-PCR	Fusions-PCR	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
for	forward	Triton X-100	Polyoxyethylen(9,10) <i>p</i> - <i>t</i> -octylphenol
g	Gramm	U	Unit (Enzymeinheit)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (Green Fluorescent Protein)	ÜN	über Nacht
h	Stunde	UV	Ultraviolett
k	kilo	v/v	Volumen-zu-Volumen-Verhältnis
kb	Kilobasenpaare	VDE	Violaxanthin-De-Epoxidase
kDa	Kilo-Dalton	WT	Wildtyp
Kan	Kanamycin	w/v	Gewicht pro Volumen
KPP	Kaliumphosphatpuffer	XDH	Xanthindehydrogenase
kV	kilo Volt	XO	Xanthinoxidase
l	Liter	XOR	Xanthinoxidoreduktasen
LEA-Proteine	Lagerreserven und späten-Embryogenese abhängigen Proteine	ZEP	Zeaxanthin-Epoxidase
M	Molarität		
m	milli		
mA	Milliampere		

1.0 Einleitung

1.1 Pappel als Modellorganismus

In der biologischen Forschung sind Modellorganismen, an denen Genfunktionen untersucht werden können, von großer Bedeutung. Für dikotyle Pflanzen nimmt *Arabidopsis thaliana* eine zentrale Rolle ein. Bei *A. thaliana* handelt es sich um eine Pflanze mit kleinem Wuchs, einer geringen Genomgröße und einem schnellen Lebenszyklus. *A. thaliana* besitzt eine breite natürliche Verteilung und kann leicht transformiert werden (Taylor, 2002). Jedoch eignet sich *Arabidopsis* nicht für alle Untersuchungen, da es sich um eine krautige, einjährige Pflanze handelt. An ihr können baumspezifische Fragestellungen wie Holzbildung, mehrjähriges Wachstum und Saisonalität nicht analysiert werden (Jansson and Douglas, 2007). Gerade die lange Lebensdauer macht den Unterschied von Bäumen zu krautigen Pflanzen deutlich. Aus diesem Grund ist ein Modellorganismus für Bäume erforderlich. Die Pappel ist inzwischen auf Grund diverser Eigenschaften als Baummodell etabliert. Die Gattung *Populus* besteht aus ungefähr 30 Arten und ist breit in der nördlichen Hemisphäre verteilt. Die Pappel zeigt einer der schnellsten Wachstumsraten bei Bäumen aus der gemäßigten Zone (Taylor, 2002). Das Holz ist zerstreut porig, gering an Gewicht und die Bäume können eine Größe von 40 m in weniger als 20 Jahren erreichen (Bradshaw et al., 2000). *Populus* war die erste holzige Gattung, an der genetische Modifikationen möglich waren. Direkter Gentransfer ist mit DNA-Beschuss, Elektroporation und indirekter Gentransfer mittels Agrobakterien möglich. Außerdem weist *Populus* ein für Bäume relativ kleines Genom auf (Taylor, 2002).

Tab. 1: Genomgrößen von *Arabidopsis*, *Pinus* und *Populus* im Vergleich (Taylor, 2002)

Species	Genomgröße (Mbp)
Arabidopsis	100-150
Pinus	20.000
Populus/Salix	450-550

Das *Populus* Genom ist ungefähr viermal so groß wie das von *Arabidopsis*, aber in etwa 40mal kleiner als das von Nadelbäumen, wie *Pinus* (Tab. 1). Das Genom von *P. trichocarpa* ist komplett sequenziert (Tuskan et al., 2006) und es stehen online-Datenbanken zur Genanalyse zur Verfügung. Des Weiteren weist *Populus* eine enge Verwandtschaft zu *Arabidopsis* auf, denn sie gehören beide zu dem Angiospermenstamm Eurosids (Abb. 1).

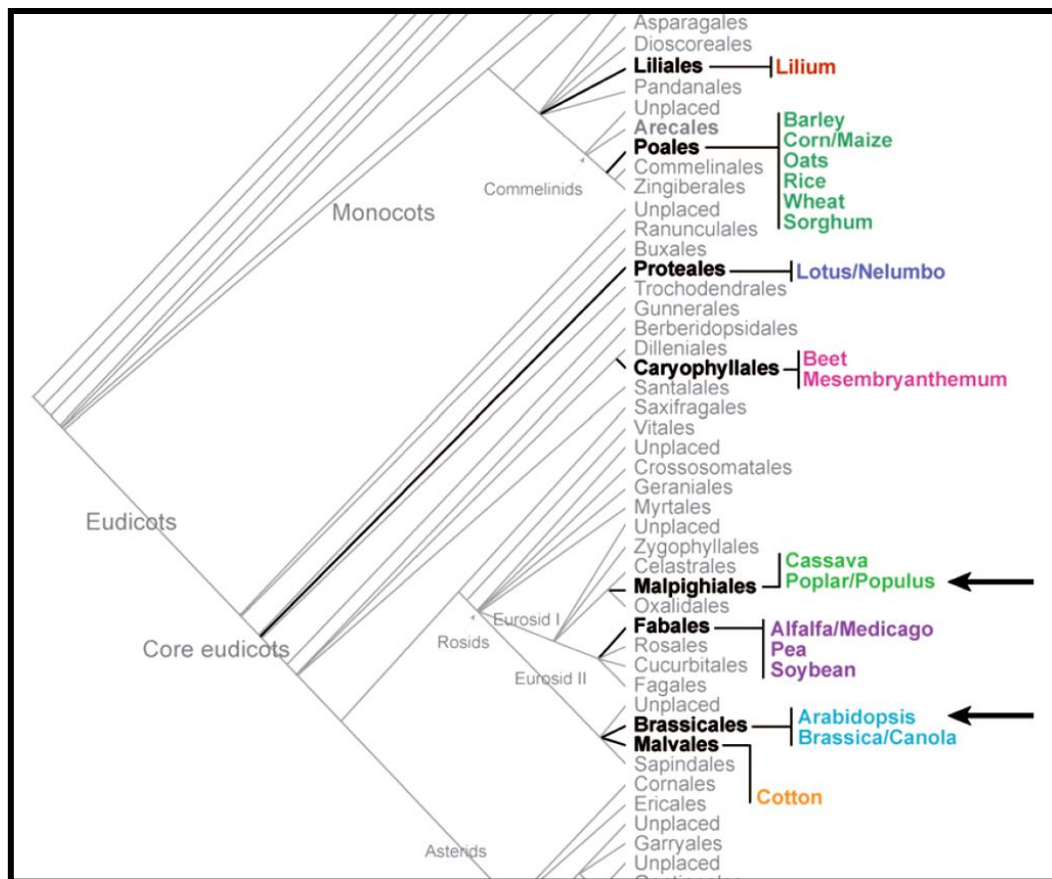


Abb. 1: Angiospermen-Phylogenie zeigt den Eurosidstamm, der Populus und Arabidopsis enthält (Jansson and Douglas, 2007).

Bei Vergleichen von ESTs zeigte sich ein hoher Grad an Identität zwischen den Genen von Populus und Arabidopsis, was vergleichende Genanalysen ermöglicht. Inzwischen sind mehr als zehn Populus-Genom-Datenbanken online verfügbar (Tab. 2).

Tab. 2: Genomische Datenbanken von Populus (Yang et al., 2009)

Category	Database	URL	Reference
Populus-specific	PopulusDB	http://www.populus.db.umu.se/	Sterky et al. (2004)
Populus-specific	RPOPDB	http://rpop.psc.riken.jp/	
Populus-specific	RepPop	http://csbl.bmb.uga.edu/~ffzhou/RepPop/	Zhou and Xu (2009)
Populus-specific	Transcription Factors	http://dptf.cbi.pku.edu.cn/	Zhu et al. (2007)
Populus-specific	POPARRAY	http://popgenome.ag.utk.edu/mdb/index.php	
Populus-specific	PopGenIE	http://www.popgenie.db.umu.se/popgenie/	Sjödén et al. (2008)
Populus-specific	JGI Populus genome	http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html	Tuskan et al. (2006)
Comprehensive	ChromDB	http://www.chromdb.org/org_specific.html?o = POPTR	Gendler et al. (2008)
Comprehensive	PlantGDB	http://www.plantgdb.org/	Duvick et al. (2008)
Comprehensive	Gramene	http://www.gramene.org/	Liang et al. (2008)
Comprehensive	PLEXdb	http://www.plexdb.org/index.php	Wise et al. (2007)
Comprehensive	Phytozome	http://www.phytozome.net/index.php	

Mit der Untersuchung einer zweiten dikotylen Pflanze können nun vergleichende Analysen durchgeführt werden. Populus kann Einblicke in die Evolution des Pflanzengenoms,

Genfamilienstrukturen und in biologische Prozesse geben, die wenig in Arabidopsis entwickelt wurden. Die Rate der Genevolution scheint in Populus viel langsamer abgelaufen zu sein als in Arabidopsis, was wahrscheinlich in der langen Generationszeit von Pappeln begründet ist (Jansson and Douglas, 2007). Nach der Keimung dauert es ungefähr sechs Jahre bis die Pappel blüht und fruchtet (Taylor, 2002).

Durch das steigende Interesse an Populus, was an industrieller Bedeutung der Pappel und der Erforschung von baumspezifischen Eigenschaften liegt, kam es in den letzten 20 Jahren zu einer drastischen Erhöhung der Veröffentlichungen, die mit dem Pappelgenom zusammenhängen (Abb. 2).

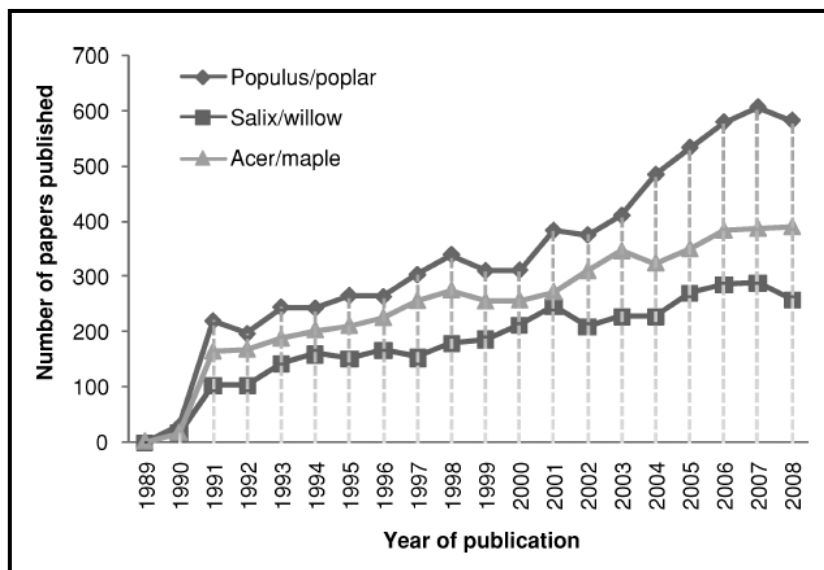


Abb. 2: Anzahl der wissenschaftlichen Veröffentlichungen in Zusammenhang mit dem Genom von Populus (Pappel), Salix (Weide) und Acer (Ahorn) von 1989 bis 2008 (Yang et al., 2009)

Bäume sind von großem Interesse für die Industrie. Pappel wird weltweit in Plantagen für die Produktion von Zellstoff, Papier, Furnier, Holzwole und Bauholz angebaut (Bradshaw et al., 2000; Taylor, 2002). Weltweit werden ungefähr 6,7 Millionen Hektar Pappeln angepflanzt, davon 3,8 Millionen zur Holzproduktion und 2,9 Millionen zum Umweltschutz. An Flussufern vermindern Pappeln die Erosion und verbessern außerdem die Wasserqualität (International Poplar Commission: Report of the 22nd Session of the Commission and of the 42nd Session of its Executive Committee 2004).

Außerdem gewinnt Pappel als Bioenergielieferant und auch in Folge des Kyoto-Protokolls als Karbonfixierer an Bedeutung (Bradshaw et al., 2000; Taylor, 2002).

1.2 Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA)

Das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen werden über Regulatoren gesteuert. Phytohormone sind solche Regulatoren. Abscisinsäure ist eins der fünf „klassischen“ Phyto-

hormone (Kende and Zeevaart, 1997) und steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Es wurde 1963 von Ohkuma et al. als Abscission-Faktor mit dem Namen „Abscisin II“ isoliert.

ABA spielt eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen wie Samenentwicklung, Dormanz, Keimung, vegetativem Wachstum und Stressantworten. Diese vielfältige Beteiligung an diversen Vorgängen macht eine vielschichtige ABA-Regulation notwendig. Dazu zählen die Biosynthese, der Katabolismus, die Signalwahrnehmung und –weiterleitung.

Der ABA-Gehalt in der Pflanze steigt drastisch bei der Samenreifung und bei umweltbedingtem Stress an. Da sich bei ABA-defizienten Mutanten der basale Hormongehalt unter normalen Bedingungen nicht deutlich vom Wildtyp-Level unterscheidet, sind Forschungen nur unter Bedingungen möglich, die zu einer signifikanten Steigung der ABA-Werte führen. Aus diesem Grund ist vor allem die ABA-Beteiligung bei der Samenreifung und der Stressantwort untersucht (Xiong and Zhu, 2003). Während der Samenentwicklung löst ABA die Embryoreifung, die Synthese von Lagerreserven, von späten-embryogenese-abhängigen Proteinen (LEA-Proteine), sowie die Einleitung der Samenruhe aus. Zwar ist ABA nicht alleinig für diese Prozesse verantwortlich, jedoch kommt dem Hormon dabei eine zentrale Rolle zu (Phillips et al., 1997). In vegetativen Geweben kommt es bei umweltbedingten Stresssituationen wie Trockenheit, Salz und, in geringerem Maße, Kälte zum Anstieg des ABA-Gehaltes (Xiong and Zhu, 2003). Die Funktion von ABA besteht darin während des vegetativen Wachstums die osmotische Homöostase aufrechtzuerhalten (Finkelstein and Rock, 2002). ABA verursacht den Schluss der Stomata, um den Wasserverlust durch die Transpiration zu minimieren. Des Weiteren mindert ABA die stressbedingten Schäden durch Aktivierung von vielen die Stressantwort betreffenden Genen. Diese bewirken die Expression von Enzymen, die die Synthese von Osmolyten und LEA-Proteinen verursachen. Dies führt zur Erhöhung der Stresstoleranz (Xiong and Zhu, 2003).

1.3 Die ABA-Biosynthese und Katabolismus

Bei ABA handelt es sich um ein Isoprenoid. Die ABA-Biosynthese ist bisher nicht für Pappel untersucht worden, jedoch wird allgemein davon ausgegangen, dass sie analog zu der Synthese in Arabidopsis abläuft (Abb. 3).

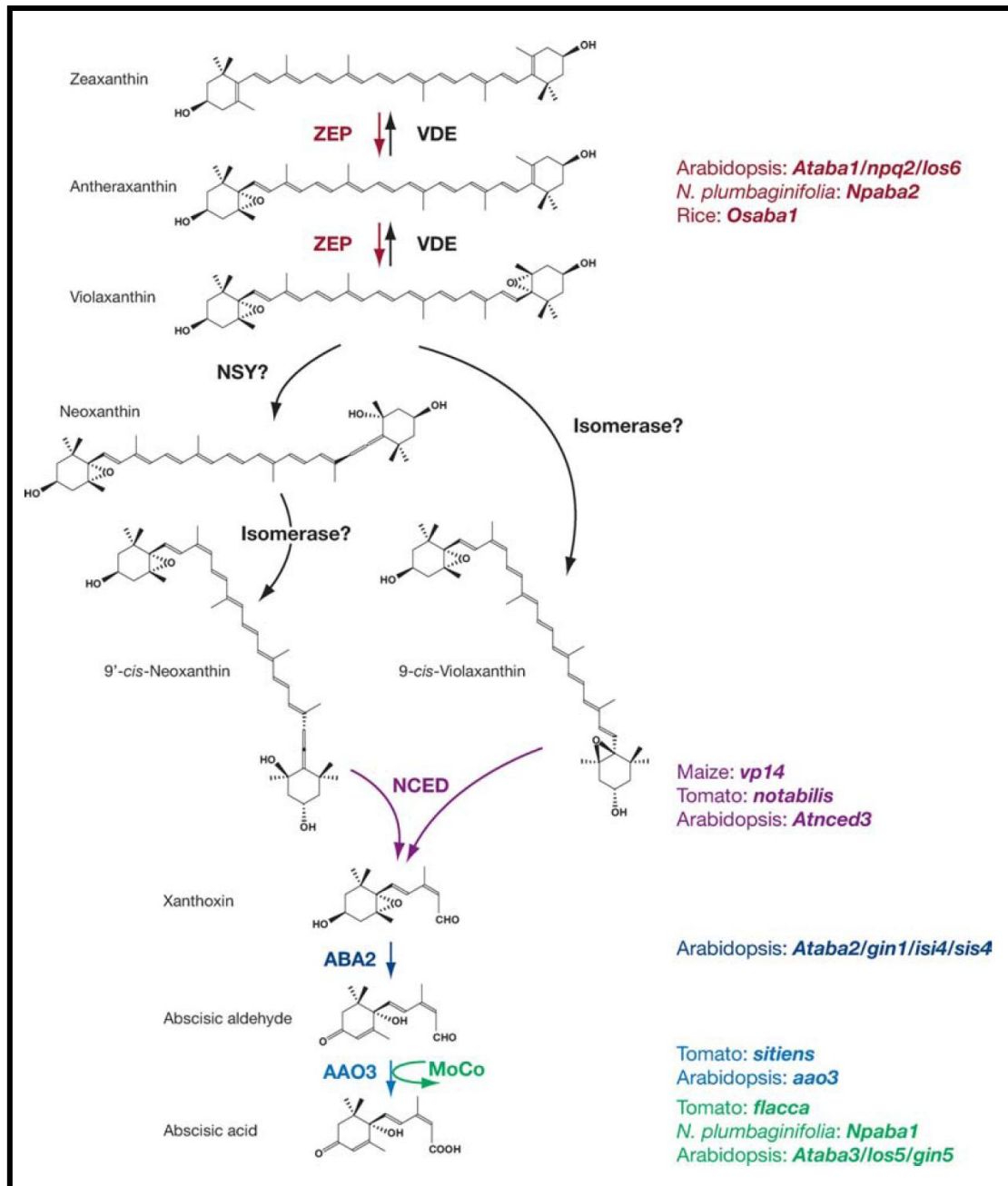


Abb. 3: Schema der ABA-Biosynthese. Die Synthese von Violaxanthin wird von der Zeaxanthin-Epoxidase (ZEP) katalysiert. Die Rückreaktion tritt in Chlorplasten bei Starklicht-Bedingungen auf durch die Violaxanthin-De-Epoxidase (VDE). Die Formation der cis-Isomere von Violaxanthin und Neoxanthin erfordert wahrscheinlich zwei Enzyme: eine Neoxanthin-Synthase (NSY) und eine Isomerase. Die Spaltung der cis-Xanthophyll wird durch eine Genfamilie der Neun-Cis-Epoxy-carotenoid-Dioxygenase (NCED) katalysiert. Xanthoxin wird dann durch eine Kurzketten-Alkohol-Dehydrogenase (ABA2) zu AB-Aldehyd umgewandelt, das durch die Abscisin-Aldehydoxidase (AO3) zu ABA oxidiert. Das Apoprotein der AO3 wird durch die Moco-Sulfurase ABA3 aktiviert (Nambara and Marion-Poll, 2005).

Der Ausgangspunkt der ABA-Biosynthese in Arabidopsis ist β -Carotin. Die zwei Ringe des β -Carotins werden hydroxyliert und so entsteht das Xanthophyll Zeaxanthin. Die Zeaxanthin-Epoxidase (ZEP) katalysiert die Epoxidierung von Zeaxanthin über Antheraxanthin zu Violaxanthin (Taylor et al., 2000). Im nächsten Schritt erfolgt die Bildung von Neoxanthin. Es

ist noch nicht geklärt, welches Enzym diese Reaktion katalysiert. Es konnten bereits putative Neoxanthin-Synthase-Gene (NSY) von Tomate und Kartoffel isoliert werden, jedoch wurde kein Homolog in Arabidopsis gefunden. Die Umwandlung von Neoxanthin zu 9'-cis-Neoxanthin und von Violaxanthin zu 9'-cis-Violaxanthin vollzieht sich möglicherweise mit Hilfe von Isomerasen. Der nächste Schritt besteht in Abspaltung der cis-Isomere von Neoxanthin und Violaxanthin zu einem C₁₃-Produkt, dem Xanthoxin, durch die Neun-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase (NCED). In allen bisher untersuchten Organismen konnte eine NCED-Gen-Familie gefunden werden. Bis zu dieser Reaktion sind alle Schritte der ABA-Biosynthese im Plastiden lokalisiert. Im Cytosol erfolgt dann die Umwandlung von Xanthoxin zu ABA. Bei ABA2 handelt es sich um eine Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktase, die die Reaktion von Xanthoxin zu AB-Aldehyd katalysiert. Die Oxidation von AB-Aldehyd zu ABA ist der finale Schritt der Biosynthese und geschieht mit Hilfe der Aldehydoxidase (AO). Die AO besitzt einen Molybdäncofaktor (Moco) und benötigt eine finale Sulfurierung des Mocos (Bittner et al., 2001; Nambara and Marion-Poll, 2005; Seo and Koshiba, 2002; Taylor et al., 2000).

Der Katabolismus kann in zwei Reaktionstypen eingeteilt werden, die Hydroxylierung und die Konjugation (Abb. 4). Es gibt drei verschiedene Hydroxylierungswege, die jeweils eine Methylgruppe der Ringstruktur von ABA oxidieren (C-7', C-8' oder C-9'). Die 8'-Hydroxylierung wird durch eine Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert und es folgt die spontane Isomerisierung zu Phaseinsäure (PA). Obwohl dieser Vorgang *in-vitro* ohne Enzyme ablaufen kann, wird von einer enzymatischen Reaktion im lebenden System ausgegangen. Ungefähr 98% des 8'-Hydroxy-ABAs liegt als PA unter normalen Bedingungen vor. PA wird durch eine Reduktase weiter zu Dihydrophaseinsäure (DPA) umgewandelt. Die 8'-Hydroxylierung ist der häufigste Inaktivierungsweg, weshalb PA und DPA weitverbreitete ABA-Kataboliten darstellen. Die 7'-Hydroxylierung findet zwar bei verschiedenen Pflanzenspezies statt, produziert aber ein eher unbedeutendes Katabolit. In den unreifen Samen von *Brassica napus* sind 9'-Hydroxy-ABA und das Isomer neoPA die meist vorhandenen Kataboliten.

Konjugiert werden können Carboxylgruppe (C-1) und die Hydroxylgruppen von ABA und seinen bereits hydroxylierten Kataboliten. ABA-Glycosylester (ABA-GE) ist das verbreitetste Konjugat. Es entsteht durch die Konjugierung der Carboxylgruppe. Bislang ist man davon ausgegangen, dass die ABA-Konjugate physiologisch inaktiv sind und in der Vakuole angereichert werden. Nach neueren Erkenntnissen soll ABA-GE aber am Langstreckentransport beteiligt sein. Außerdem wird ABA aus ABA-GE durch die β -D-Glucosidase in Weizen, Gerste und Sonnenblume wieder freigesetzt. Die β -D-Glucosidase-Aktivität wird durch Salinität induziert und durch ABA-GE inhibiert (Nambara and Marion-Poll, 2005).

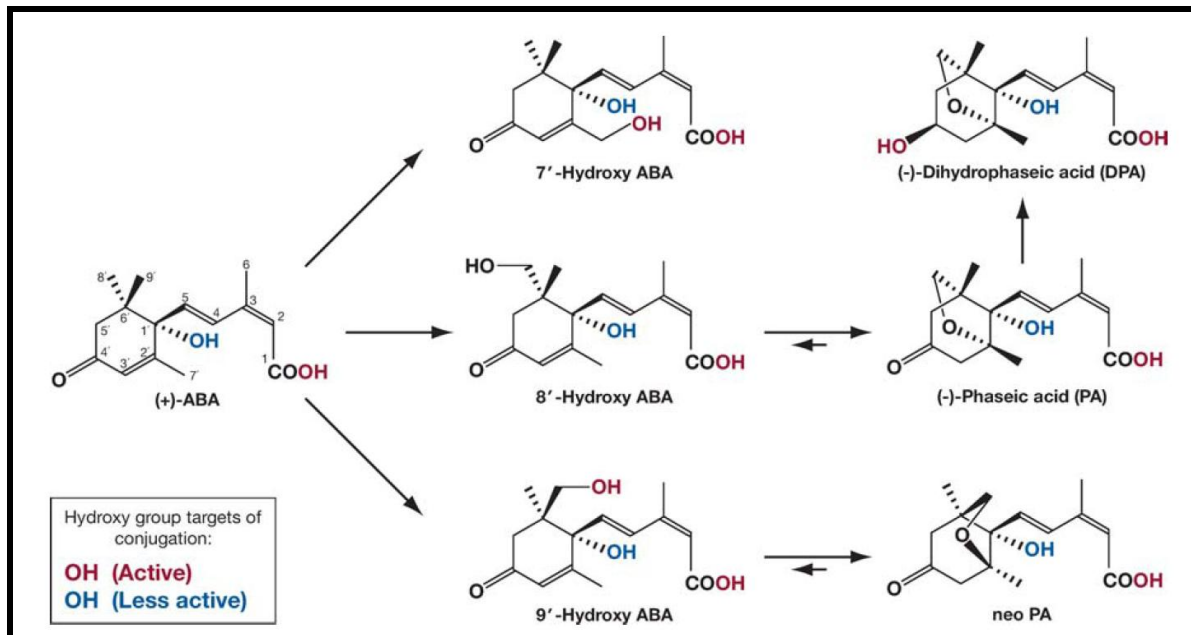


Abb. 4: Schema des ABA-Katabolismus. Es sind drei verschiedene Hydroxylierungswege gezeigt. Die 8'-Hydroxylierung ist der Hauptweg des ABA-Katabolismus. Die farblich markierten OH-Gruppen zeigen die möglichen Konjugationspositionen, die roten sind dabei bevorzugt (Nambara and Marion-Poll, 2005).

Die Menge an ABA wird durch das präzise Gleichgewicht zwischen der Biosynthese und dem Katabolismus reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der NCED aus Arabidopsis mit dem ABA-Gehalt korreliert und die Überexpression zu einem Anstieg von ABA führt (Nambara and Marion-Poll, 2005). Außerdem katalysiert die NCED3 unter Trockenstress den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (Iuchi et al., 2001; Tan et al., 2003). Zusätzlich berichten Melhorn et al. (2008) von einem regulatorischen Effekt der AAO3 aus Arabidopsis. Jedoch führte auch die Überexpression der ZEP zu einer Erhöhung des ABA-Gehaltes (Park et al., 2008). Die Carotinoid-Synthese beeinflusst ebenfalls den ABA-Level, so dass insgesamt die Regulation von ABA nicht nur auf bestimmte Schritte beschränkt ist, sondern auch mit der up-stream-Synthese koordiniert ist. Die ABA-8'-Hydroxylase ist wahrscheinlich das hauptsächliche regulatorische Enzym im Katabolismus. Bisherige Untersuchungen der Regulation der ABA-Biosynthese verliefen in erster Linie auf transkriptioneller Ebene. Durch Trockenstress kam es zur erhöhten Expression der NCED3, AAO3, ABA3 und ZEP aus Arabidopsis (Nambara and Marion-Poll, 2005).

1.4 Das Spurenelement Molybdän und der Molybdäncofaktor

Die finale Oxidation von AB-Aldehyd wird von der AO katalysiert. Bei der AO handelt es sich um ein sogenanntes Molybdoenzym, denn es benötigt für seine Aktivität einen Molybdäncofaktor (Moco).

Molybdän (Mo) ist ein essentielles Spurenelement für Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen. Der Name stammt von dem griechischen Ausdruck für „bleiartig“ (*molybdos*), da es lange mit Bleiglanz verwechselt wurde. Als Schwermetall steht es in der 6. Nebengruppe des Periodensystems (Chromgruppe) und besitzt die Ordnungszahl 42. In der Gruppe ist es das einzige biologisch aktive Metall. Mehr als 50 verschiedene Molybdänenzyme sind bekannt, jedoch sind die meisten bakterieller Herkunft. In allen Organismen ist Mo an ein Pterin gebunden, wodurch der Moco entsteht. Alle Enzyme, die Mo enthalten, nutzen den pteringe-bundenen Typ des Cofaktors mit Ausnahme der Nitrogenase (Mendel, 2007). Molybdoenzyme sind an wichtigen Redoxreaktionen des Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelkreislaufes beteiligt (Hille, 1996).

Die Entdeckung des Mocos begann 1930, als Bortels den positiven Einfluss von Mo auf das Wachstum des stickstofffixierenden Bodenbakteriums *Azotobacter chroococcus* feststellte. Erst neunzehn Jahre später wiesen Mangelercheinungen bei Feldpflanzen auf eine Mo-Defizienz hin (zusammengefasst durch Gupta, 1997). Ein Xanthinoxidase-Faktor aus Rattenleber und -magen (Westerfeld and Richter, 1949) stellte sich als ein Molybdatsalz heraus, das essentiell für die Aktivität der Xanthinoxidase ist (De Renzo et al., 1953). Molybdat schien also direkt mit einem Enzym und einer Flavinkomponente verknüpft zu sein. Die Interaktion des Metalls mit Enzymen konnte für die Nitratreduktase aus *Neurospora crassa* (Nicholas and Nason, 1954), eine tierische AO (Mahler et al., 1954) und die tierische Sulfinoxidase gezeigt werden. Der gleichzeitige Aktivitätsverlust der Xanthindehydrogenase und Nitratreduktase in *Aspergillus nidulans* wies auf einen gemeinsam genutzten Cofaktor mit Mo als biologisch aktives Metall hin (Pateman et al., 1964). Die Regeneration der Nitratreduktase-Mutante *nit-1* gelang durch die Zugabe von denaturierten Molybdoenzymen (Xanthindehydrogenase, Aldehydoxidase, Sulfinoxidase) aus pflanzlichem, tierischem und bakteriellem Ursprung (Ketchum et al., 1970; Nason et al., 1970). Diese *nit-1*-Mutante besitzt lediglich das inaktive Apoprotein der Nitratreduktase. Durch die Regeneration konnte der Beweis für einen universellen, dissoziierbaren Moco erbracht werden (Mendel, 1992). Strukturuntersuchungen von Johnson und Rajagopalan (1980; 1982) zeigten, dass das Molybdän durch ein Pterin (Molybdopterin) als organische Komponente über eine Dithiolengruppe am C1 und C2 komplexiert wird. Der Cofaktor enthält eine 4C-Alkylseitenkette und

einen terminalen Phosphatrest (Abb. 5). Den endgültigen Beleg des Molybdäncofaktors (Moco) lieferte die Kristallstrukturaufklärung (Schindelin et al., 1996).

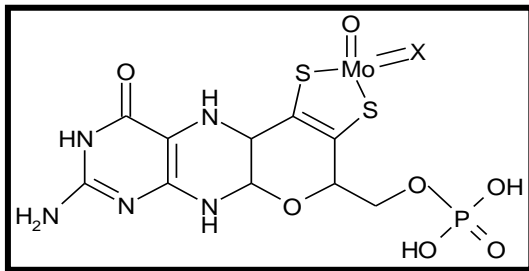


Abb. 5: Struktur des eukaryotischen Molybdäncofaktors. Es treten einige Varianten in den Eubakterien auf, bei denen die Alkyl-Seitenkette über eine Pyrophosphat-Bindung mit einem Nukleotid verbunden ist. Bei der Monooxo-Form steht das X für ein S und bei der Dioxo-Form für ein O.

1.5 Die Molybdäncofaktor-Biosynthese

Die Biosynthese des Mocos wurde in *Escherichia coli* (Rajagopalan, 1996) und in verschiedenen Eukaryoten aufgedeckt (Müller and Mendel, 1989; Mendel, 1992; Mendel, 1997; Mendel and Schwarz, 1999; Mendel and Schwarz, 2002). In Pflanzen und den bisher untersuchten Organismen ist die Moco-Synthese stark konserviert und kann in vier Schritte unterteilt werden (Abb. 6): die Umwandlung von GTP in cPMP (zyklisches Pyropterin-Monophosphat), die Synthese des Molybdopterin (MPT), Adenylierung des MPTs und der Molybdäninsertion (Mendel, 2007). Die Gene, die bei der Biosynthese beteiligt sind, tragen die Bezeichnung *cnx* (Cofaktor für Nitratreduktase und Xanthindehydrogenase). In Pflanzen sind sechs *cnx*-Gene beteiligt (Schwarz and Mendel, 2006). Diese besitzen eine hohe Identität zu ihren Homologen in Bakterien, Menschen und Pilzen.

Im ersten Schritt wird ein phosphoryliertes Guanosinderivat (wahrscheinlich GTP) in eine schwefelfreie Pterinverbindung umgewandelt, das cPMP. Diese Reaktion wird von den Enzymen Cnx2 und Cnx3 katalysiert. Cnx2 besitzt ein Eisen-Schwefel-Cluster und gehört zu den S-Adenosylmethionin(SAM)-abhängigen Radikalenzymen. Jedes C-Atom der Ribose und des Guaninringes wird in cPMP eingebaut.

Im zweiten Schritt werden zwei Schwefelatome in cPMP durch die MPT-Synthase eingebaut, wobei MPT entsteht. Die MPT-Synthase ist ein heterotetramer Komplex von zwei kleinen (Cnx7) und zwei großen (Cnx6) Untereinheiten. Der zu übertragende Schwefel ist als Thio-carboxylat an den C-Terminus von Cnx7 gebunden. Nach der Übertragung der zwei Schwefelatome muss die MPT-Synthase resulphuriert werden. Diese Aufgabe übernimmt Cnx5, welches ein zwei Domänenprotein darstellt. Der N-Terminus adenyliert die MPT-Synthase, wohingegen der C-Terminus als Rhodanese-like Domain den Schwefel an ein konserviertes Cystein in Form eines Persulfites bindet. Die Quelle des Schwefels ist bisher nicht geklärt.

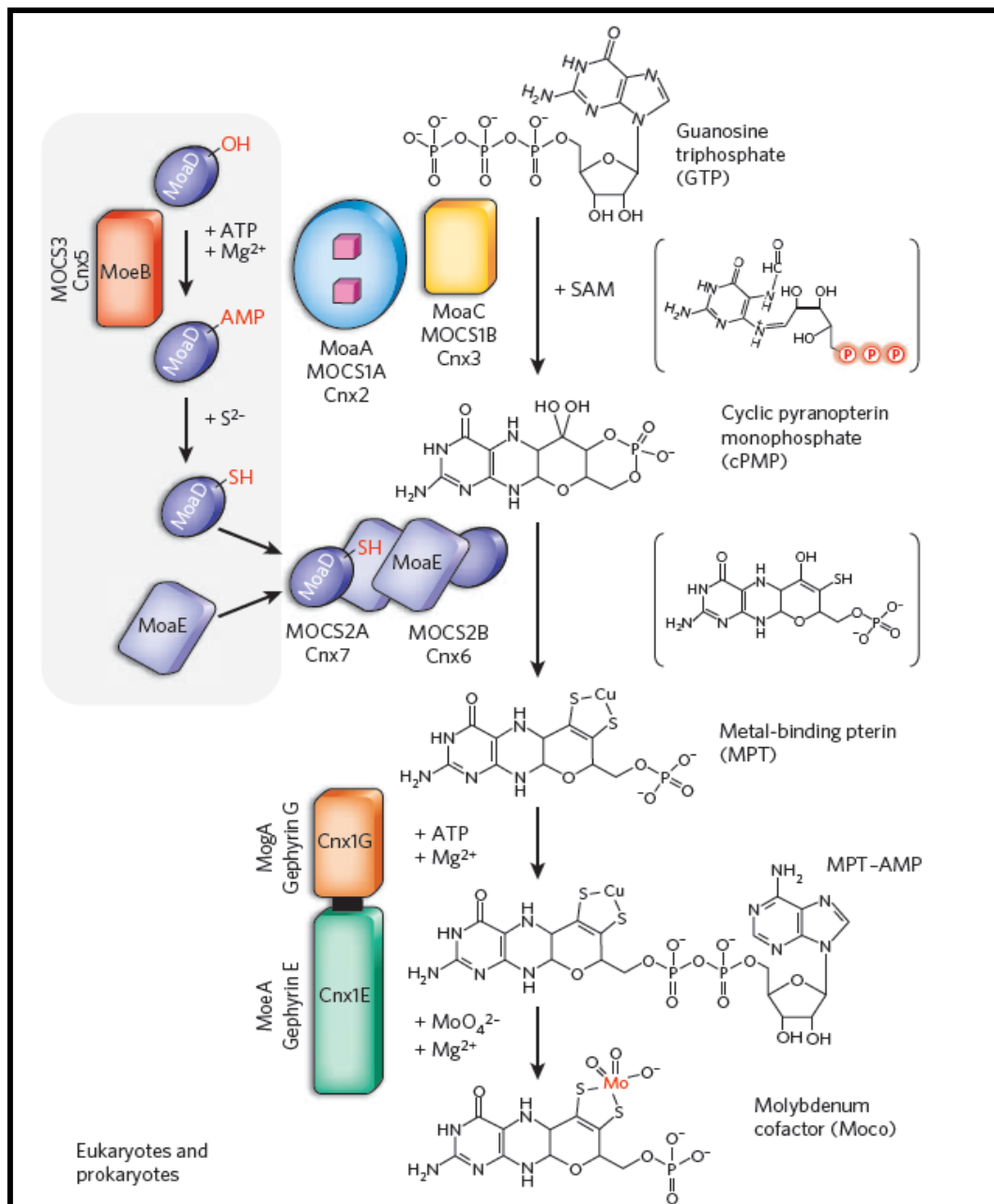


Abb. 6: Biosynthese des Molybdäncofaktors. Das allgemeine Schema beruht auf den Daten, die aus *E. coli*, Pflanzen und Menschen gewonnen werden konnten. Die Homologien der für die Biosynthese verantwortlichen Proteine sind nach verschiedenen Nomenklaturen für Pflanzen (Cnx), Menschen (MOCS) und *E. coli* (MO) angegeben. Es sind die vier Schritte der Biosynthese mit den entsprechenden Intermediaten gezeigt: die Umwandlung von GTP in cPMP (cyclic pyranopterin monophosphate), die Synthese von Molybdopterin (MPT) bzw. Metall-bindendes Pterin, die Adenylierung des MPTs und die Molybdäninsertion (Schwarz et al., 2009).

Im dritten Schritt erfolgt die Adenylierung des MPTs als Vorbereitung der Mo-Insertion. Dies wird von dem zwei-Domänen-Enzym Cnx1 katalysiert. Die C-terminale Domäne (Cnx1-G) baut eine starke Bindung zu MPT auf. Die N-terminale Domäne (Cnx1-E) adenyliert MPT in einer von Mg²⁺- und ATP-abhängigen Reaktion und bildet MPT-AMP, das an Cnx1-G gebunden bleibt.

Im letzten Schritt geschieht die Mo-Insertion. Bei der Aufklärung der Kristallstruktur von MPT (Kuper et al., 2004) wurde ein Kupferatom entdeckt, das an das Dithiolat des MPTs gebunden ist. Die Funktion des Kupfers ist noch nicht bekannt. Möglich ist eine Beteiligung bei der Schwefelübertragung auf cPMP, ein Oxidationsschutz des Dithiolats und/oder eine Erstellung einer geeigneten Abgangsgruppe bei der tatsächlichen Mo-Insertion. Obwohl der Ursprung des Kupfers noch ungeklärt ist, erscheint es wahrscheinlich, dass es zur Bindung an das Thiolat gleich nach Schritt 2, der MPT-Synthese kommt. Im letzten Schritt der Moco-Synthese wird MPT-AMP an die Cnx1-E-Domäne gebunden, wo das Adenylat abgespalten wird, das Kupfer freigesetzt und Mo in Form von MoO_4^{2-} inseriert wird.

Der Moco ist sehr instabil, wenn er, ohne an Proteine gebunden zu sein, frei in der Zelle vorliegt. Aus diesem Grund werden Moco-Carrier-Proteine vermutet. In Bakterien sind solche Proteine identifiziert worden, ebenso wie in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. In höheren Pflanzen sind zwar Homologe zu dem Protein aus *C. reinhardtii* gefunden worden, jedoch ist es unklar, ob diese als Moco-Speicherproteine dienen oder in der Insertion des Moco in die Molybdoenzyme beteiligt sind (reviewed in Mendel, 2007; Schwarz and Mendel, 2006; Schwarz et al., 2009).

1.6 Die Molybdoenzyme

Von den mehr als 50 verschiedenen Pterin-enthaltenden Molybdoenzymen kommen nur vier in Pflanzen vor: die Sulfitoxidase, Nitratreduktase, Xanthindehydrogenase und Aldehydoxidase. Jüngst konnte ein neues Molybdoenzym in Säugetieren gefunden werden, das einen Teil des mitochondrialen Amidoxim Reduktase Komplexes (mArc) bildet. Ein Homolog in Arabidopsis konnte bereits kloniert werden (F. Bittner, R. Mendel, unveröffentlichte Daten), so dass dies möglicherweise ein fünftes Molybdoenzym darstellt.

Alle vier bereits beschriebenen pflanzlichen Molybdoenzyme kommen in Pflanzen als Homodimere vor. Als Monomere sind sie inaktiv und ihre Dimerisierung ist abhängig von der Anwesenheit des Moco (Schwarz and Mendel, 2006). Die Enzyme sind auf Grund struktureller Ähnlichkeiten in zwei Familien eingeteilt: die NR/SO- und die XDH/AO-Familie.

Die Nitratreduktase (NR) ist das Schlüsselenzym des Stickstoffkreislaufes, indem es Nitrat zu Nitrit reduziert. Es ist ein cytoplasmatisches Enzym mit einer Dimergröße von 200 kDa. Das NR-Monomer aus der Moco-/Dimerisierungs-, einer Cytochrom b5- und einer FAD/NADH-Domäne (Abb. 7) (Schwarz and Mendel, 2006).

Die Sulfitoxidase (SO) ist erst vor wenigen Jahren aus *A. thaliana* kloniert worden (Eilers et al., 2001) und zeigt hohe Sequenzidentitäten zu der Moco-Domäne der NR. Die SO ist weitverbreitet und hochkonserviert unter den Pflanzen. Unter den pflanzlichen Molybdoenzymen ist die Sulfitoxidase das einfachste Enzym, da es nur ein Redoxzentrum enthält (Abb. 7). Die

SO oxidiert Sulfit zu Sulfat mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor (Hänsch et al., 2006) und spielt damit eine Rolle beim Schutz der Pflanze gegen das hochreaktive Sulfit, das viele zelluläre Komponenten angreifen kann (Lang et al., 2007). Die SO ist in den Peroxisomen lokalisiert und besitzt eine Dimergröße von ungefähr 90 kDa (Nowak et al., 2004).

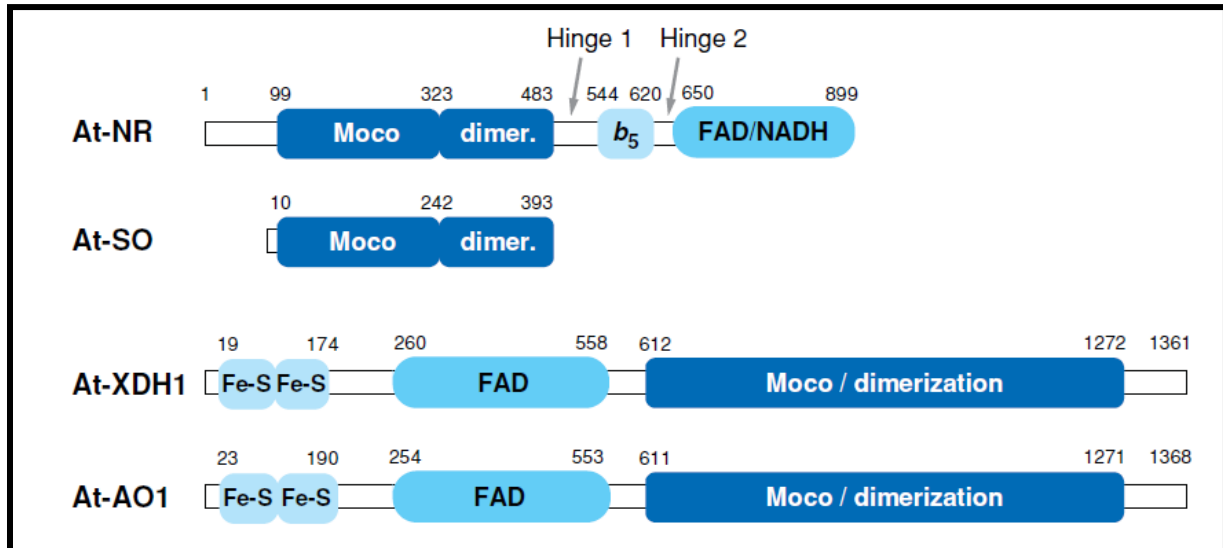


Abb. 7: Domänenstruktur der pflanzlichen Molybdoenzyme (Schwarz and Mendel, 2006).

Die Xanthindehydrogenase (XDH) gehört zu der XDH/AO-Familie. In Pflanzen kommt nur die Dehydrogenase und nicht die Oxidase-Form vor. Als Homodimer besitzt sie eine Größe von 300 kDa. Die XDH ist im Purinmetabolismus beteiligt. Dieses Enzym katalysiert die oxidative Hydroxylierung von Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnstoff. Die XDH reagiert auf verschiedene Stresssituationen, wie Trockenheit, Salinität und natürliche Seneszenz (Hesberg et al., 2004). Außerdem soll die XDH durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sein. Dazu zählen die Pflanze-Pathogen-Interaktion, Zelltod und natürliche Seneszenz (Schwarz and Mendel, 2006).

Die AO ist ein cytoplasmatisches Enzym mit einer Homodimergröße von 300 kDa. Auf Grund der hohen Sequenzidentität zur XDH wird davon ausgegangen, dass sich beide Enzyme aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben. Außerdem besitzen beide dieselbe Domänenstruktur (Eisen-Schwefel-Cluster, FAD- und Moco-Domäne) (Abb. 7). Die AO besitzt eine breite Anzahl von möglichen Substraten wie Abscisinaldehyd, Indol-3-Aldehyd, Indol-3-Acetaldehyd, Naphthylaldehyd und Benzaldehyd (Schwarz and Mendel, 2006). Die AO3 ist am letzten Schritt der ABA-Biosynthese beteiligt (Seo et al., 2000b). In einem Auxin überexprimierendem Mutanten wurde eine erhöhte AO1-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt, so dass die AO hier auch eine Rolle zu spielen scheint (Seo et al., 1998).

1.7 Die Moco-Sulfurase ABA3

Die NR/SO- und die XDH/AO-Familie unterscheiden sich ebenfalls in der Moco-Struktur. Nach der Synthese besitzt der Moco ein Dioxo-Zentrum. Bei Insertion in die SO und NR sind diese sofort aktiv. Die AO und XDH benötigen für ihre Aktivität eine posttranslationale Modifikation. Der Moco dieser beiden Enzyme wird durch die Moco-Sulfurase ABA3 sulfuriert. Dadurch entsteht ein Monooxozentrum, wodurch diese in ihre aktive Form überführt werden (Abb. 8) (Bittner et al., 2001).

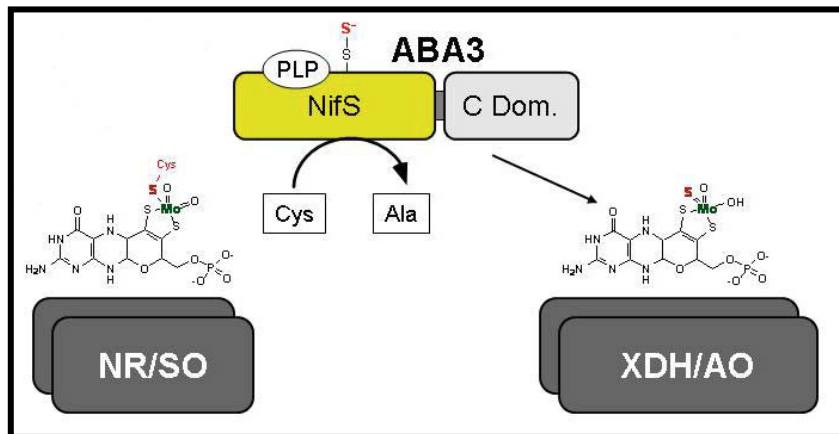


Abb. 8: Finale Sulfurierung des Molybdäncofaktors. Nach der Biosynthese wird der Moco in die Mo-Apoproteine inseriert. Die Dioxo-Mo-Enzyme NR und SO werden dadurch direkt aktiv. Der Cofaktor der AO und XDH muss final sulfuriert werden, um diese in ihre aktive Form zu überführen (Schwarz and Mendel, 2006).

Der Schwefeleinbau geschieht nicht durch die Apoproteine selbst, sondern durch ein anderes Enzym, die Moco-Sulfurase ABA3. Dieses Protein besteht aus zwei Domänen, der N-terminalen NifS-ähnlichen Domäne und dem C-Terminus, und arbeitet als Homodimer (Mendel, 2007). NifS Proteine katalysieren die Umwandlung von L-Cystein zu L-Alanin und elementarem Schwefel für die Eisen-Schwefel-Cluster-Synthese. Dieser Mechanismus der Schwefelmobilisation konnte auch für ABA3 gezeigt werden. Das Protein besitzt ein Pyridoxalphosphat bindendes Motiv, von welchem die Reaktion abhängig ist. Der elementare Schwefel wird von einem hochkonservierten Cystein-Rest als Persulfid gebunden. Zusätzlich zu dieser Cysteindesulfurase-Aktivität konnte noch eine Selenocysteinsulfurase-Aktivität gezeigt werden. Obwohl Selenocystein innerhalb der Zelle als Substrat unwahrscheinlich ist, wird es dennoch effektiver umgesetzt als L-Cystein. Neben dem mitochondrialen AtNFS1 und dem plastidären ATNFS2 konnte mit dem cytosolischen ABA3 die dritte Cysteindesulfurase gefunden werden (Heidenreich et al., 2005).

Wollers et al. (2008) geben den ersten Hinweis auf die Funktion des C-Terminus. Der Moco wird von dem C-Terminus mit einer hohen Affinität gebunden. Außerdem konnten Hinweise gewonnen werden, dass die sulfurierte Form des Mocos gebunden wird. Es wird vermutet, dass der C-Terminus als „Gerüstprotein“ arbeitet, denn dort wird der Dioxo-Moco gebunden und zum Monooxo-Moco sulfuriert bevor es zur Aktivierung der AO und XDH kommt. Jedoch ist noch ungeklärt, ob nur der Schwefel, der am C-Terminus an den Moco gebunden ist, an

die Apoproteine übertragen oder ob der komplette sulfurierte Moco inseriert wird (Mendel, 2007).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Verbesserung diverser Stressantworten und eine damit einhergehende Erhöhung der Resistenz stellt ein wichtiges Aufgabengebiet der Pflanzenbiologie dar. Bei einem wichtigen Stresssignal handelt es sich um ABA. Die Regulation der ABA-Biosynthese ist bisher in erster Linie in *A. thaliana* untersucht und dort weitestgehend aufgeklärt worden (Ikegami et al., 2009; Melhorn et al., 2008; Nambara and Marion-Poll, 2005; Xiong and Zhu, 2003). Im Modellorganismus *Populus* existieren kaum Erkenntnisse über die Regulation der Synthese. Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in der Aufklärung der Regulation von ABA, gesteuert über das Molybdoenzym Aldehydoxidase und seinen Aktivators ABA3. Diese Arbeit beschäftigte sich mit folgenden Aspekten:

(1) *In-silico*-Untersuchungen

- Identifizierung der Aldehydoxidase-, Xanthindehydrogenase- und ABA3-Sequenz im *P. trichocarpa*-Genom
- Vergleich der Sequenzen mit den *A. thaliana*-Homologen
- Identifizierung der putativen Promoterregionen

(2) Methodenetablierung

- Etablierung der AO und XDH *in-gel* Aktivitätsfärbung bei *Populus*
- Etablierung der ABA-Messung mit Agdia (USA) in *Populus*

(3) Erzeugung transgener Pappeln mit folgenden Konstrukten

- PtAO-RNAi
- AAO3 Überexpression
- PtAO-Promoter-GUS-Fusion
- PtABA3-RNAi
- AABA3-Überexpression
- PtABA3-Promoter-GUS-Fusion

(4) Physiologische Untersuchungen:

- Charakterisierung der transgenen Pappel
- Hemmung der PtXDH durch Allopurinol
- AO- und XDH-Aktivitäten bei Salz- und Trockenstress, sowie ABA-Applikation
- ABA-Gehalte bei Salz- und Trockenstress, sowie ABA-Applikation
- Promoterstudien zum Salz- und Trockenstress, sowie ABA-Applikation
- Trockenstressauswirkungen auf das Transkriptom der an der ABA-Biosynthese beteiligten Gene

2.0 Ergebnisse

2.1 *In-silico*-Analysen

Es wurden *in-silico*-Analysen der AO und der XDH in *P. trichocarpa* mittels Internetrecherche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> und http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html) vorgenommen.

Es existieren verschiedene Isoformen der AO (Koshiba et al., 1996; Omarov et al., 1999; Seo et al., 1998). In *A. thaliana* sind vier Isoformen der AO bekannt: die AAO1, AAO2, AAO3 und AAO4 (Seo et al., 2000a). Auch bei *P. trichocarpa* werden diese vier Isoformen angegeben, allerdings weisen nur die PtAO1 und PtAO2 mit einer Größe von 4.119 bp (150,5 kDa) und 4.116 bp (150,2 kDa) eine realistische Größe einer AO auf, die mit *A. thaliana* vergleichbar ist (Tab. 3). Bei der PtAO3 und der PtAO4 handelt es sich bei einer Größe von 1.494 bp (54 kDa) und 469 bp (17 kDa) um trunkierte Versionen. Die Sequenz der PtAO4 zeigt große Identität im Anfangsbereich der Sequenz der PtAO1 und die PtAO3 dagegen im Endbereich. Aus diesem Grund kann von zwei Isoformen der AO in *P. trichocarpa* ausgegangen werden, nämlich der PtAO1 und der PtAO2. Diese unterscheiden sich in der Proteinsequenz mit einer Identität von 74,5% trotz vieler homologer Bereiche. Die AOs aus *A. thaliana* sind schon in vielen Publikationen beschrieben, jedoch ist nichts über die AO in *Populus* bekannt. Schwarz und Mendel (2006) veröffentlichten eine Domänenstruktur der AAO1 und der AXDH1. Anhand dieser Daten wurde auch die Domänenstruktur der PtAOs erstellt (Abb. 9). Hieran wird der ähnliche Aufbau der PtAOs und der AAO1 deutlich. Das Fe-S-Cluster, die FAD- und die Moco/ Dimerisierungs-Domäne liegen an den nahezu identischen Aminosäurepositionen im Protein. Die PtAO3 besitzt nur den hinteren Abschnitt der Moco/Dimerisierungs-Domäne. Daraus folgend ist sie sowohl im vorderen als auch im hinteren Sequenzbereich trunkiert. Die Identität mit der Moco-Domäne aus *A. thaliana* beträgt 35,1%, die mit der PtAO1 52,9%. Die PtAO4 weist eine vollständige und eine unvollständige Fe-S-Domäne auf. Insgesamt ist das Fe-S-Cluster also unvollständig, denn es ist im hinteren Sequenzabschnitt trunkiert. Die Identität mit dem Fe-S-Cluster aus *A. thaliana* ergibt eine 52,7%ige Übereinstimmung, jedoch ist Sequenzabfolge im Vergleich zur PtAO1 mit 75,4% Identität sehr ähnlich.

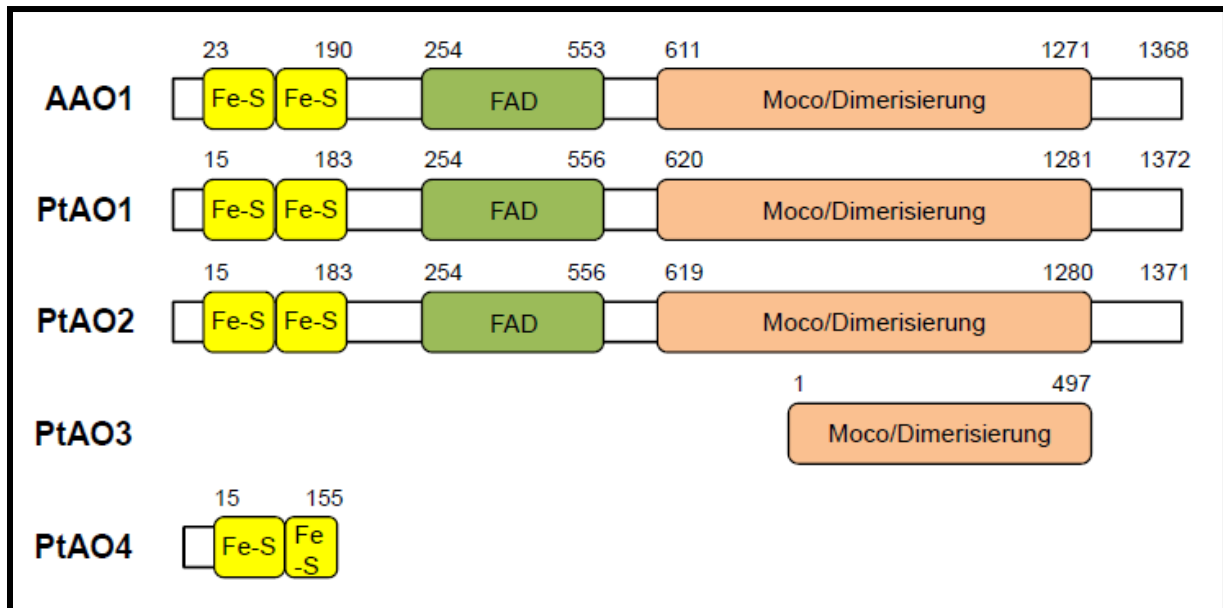


Abb. 9: Domänenstruktur der PtAOs im Vergleich zur AAO1.

Außerdem waren die Identitäten zwischen den verschiedenen PtAOs und AAOs von Interesse (Tab. 3). Die PtAO1 besitzt die größte Identität mit der AAO3 (62,3%), die geringste Analogie besteht mit der AAO1 (60,8%). Auch die Gleichheit der PtAO2 mit den AAOs liegen in diesem Bereich, die höchste Identität weist sie dabei auch mit der AAO3 (61,4%) auf und die niedrigste mit der AAO4 (59,7%).

Tab. 3: Proteinidentitäten der vier AO-Isoformen aus *P. trichocarpa* mit denen aus *A. thaliana* und untereinander (Sequenz-Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Identitäten [%] <i>A. thaliana</i>					Identitäten [%] <i>P. trichocarpa</i>			
AAO1	AAO2	AAO3	AAO4		PtAO1	PtAO2	PtAO3	PtAO4
60,8	62,3	62,1	61,1	PtAO1 (150,5 kDa)	---	74,5	35,8	10,9
				gi 224104954 ref XM_002313597.1				
59,9	60,5	61,4	59,7	PtAO2 (150,2 kDa)	74,5	---	28,0	9,4
				gi 224131693 ref XM_002328049.1				
23,9	24,1	25,8	24,4	PtAO3 (54 kDa)	35,8	28,0	---	10,9
				gi 224145732 ref XM_002336218.1				
7,9	8,9	7,8	8,2	PtAO4 (17 kDa)	10,9	9,4	10,9	---
				gi 224145728 ref XM_002336217.1				

In *A. thaliana* liegen die Identitäten der AOs untereinander auch in diesem Bereich (Tab. 4), so dass es wahrscheinlich erscheint, dass es nur bestimmte konservierte Abschnitte gibt und sich die AOs in anderen Bereichen auch stark unterscheiden können. In einem Alignment beider PtAOs und der AAOs Proteinsequenzen solche Bereiche zu erkennen (Abb. 12).

Tab. 4: Proteinidentitäten der vier AO-Isoformen aus *A. thaliana* untereinander (Sequenz-Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

	Identitäten [%]			
	AAO1	AAO2	AAO3	AAO4
AAO1 (149,6 kDa) gi 30688081 ref NM_122105.2	---	63,3	59,7	59,6
AAO2 (144,6 kDa) gi 30691399 ref NM_114228.2	63,3	---	60,9	59,7
AAO3 (146,7 kDa) gi 145329960 ref NM_001084497.1	59,7	60,9	---	73,1
AAO4 (147,3 kDa) gi 30678922 ref NM_100337.2	59,6	59,7	73,1	---

In *A. thaliana* sind zwei XDH-Isoformen, die AXDH1 und AXDH2, bekannt. AXDH2 zeigt eine 93%ige Identität mit der AXDH1 (Hesberg et al., 2004). Im Genom von *P. trichocarpa* wird eine vollständige XDH-Sequenz mit 4.118 bp (149,8 kDa) und eine trunkierte mit 1.082 bp (38,8 kDa) angegeben. Die PtXDH1 weist hohe Identitäten von 76,9% und 75,6% mit der XDH1 und XDH2 aus *A. thaliana* auf (Tab. 5). In einem Alignment der Proteinsequenzen der AXDH1 und PtXDH1 sind viele konservierte Bereiche zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Tab. 5: Proteinidentitäten der zwei XDH-Isoformen aus *P. trichocarpa* mit denen aus *A. thaliana* und untereinander (Sequenz-Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Identitäten [%] <i>A. thaliana</i>			Identitäten [%] <i>P. trichocarpa</i>	
AXDH1	AXDH2		PtXDH1	PtXDH2
76,9	75,6	PtXDH1 (149,9 kDa) gi 224106164 ref XM_002314031.1	---	11,8
11,7	11,6	PtXDH2 (38,8 kDa) gi 224090960 ref XM_002334950.1	11,8	---

Auch die Domänenstruktur der PtXDH1 (Abb. 10) zeigt diese große Ähnlichkeit zu der AXDH1 (Schwarz and Mendel, 2006). Die Lage des Fe-S-Clusters, der FAD- und der Moco/Dimerisierungs-Domäne sind nahezu identisch.

Fraglich erscheint die Zuordnung der PtXDH2. In einem Sequenzalignment mit der Moco-Domäne zeigen sich die meisten Identitäten, jedoch gibt es viele Unterschiede. Bei einem Alignment der Proteinsequenzen der beiden PtXDHs untereinander sind wenige konservierte Bereiche zu erkennen.

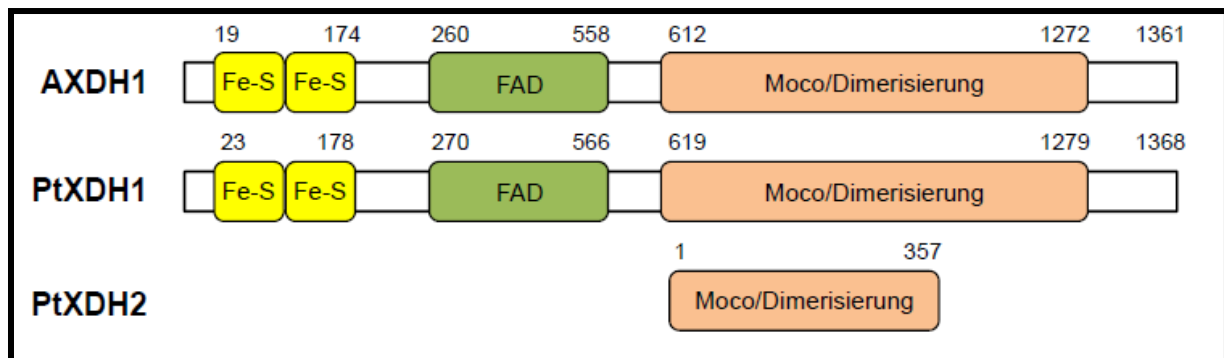


Abb. 10: Domänenstruktur der PtXDHs im Vergleich zur AXDH1.

Durch eine Internetrecherche der bekannten ABA3-Sequenz aus *A. thaliana* konnte eine Sequenz in *P. trichocarpa* gefunden werden. Die aus der Aminosäureabfolge kalkulierte Größe beträgt 91,2 kDa, die der aus *A. thaliana* mit 91,8 kDa sehr ähnlich ist. Die beiden Teilen eine 55,6%ige Identität der Proteinsequenz (Tab. 6).

Tab. 6: Proteinidentität von ABA3 aus *P. trichocarpa* und *A. thaliana*
 (Sequenz-Quelle: http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html (*P. trichocarpa*) und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (*A. thaliana*))

	Identität [%]
	AABA3
PtABA3 (91,2 kDa)	55,6
LGVII 7128235:7138368	

Trotz dieser Unterschiede ist auch bei der PtABA3 eine eindeutige Zuordnung des N-Terminus und C-Terminus durch Alignments mit den entsprechenden Termini der AABA3 (pers. Mitteilung F. Bittner) möglich (Abb. 11). Das putative PLP-bindende Motiv und putative Cystein-Motiv konnten in der PtABA3 gefunden werden.

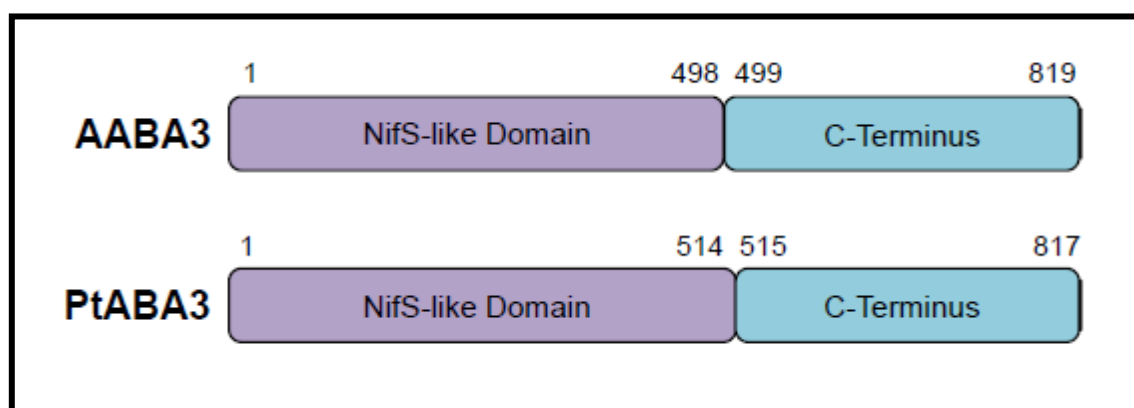


Abb. 11: Domänenstruktur der PtABA3 im Vergleich zur AABA3.

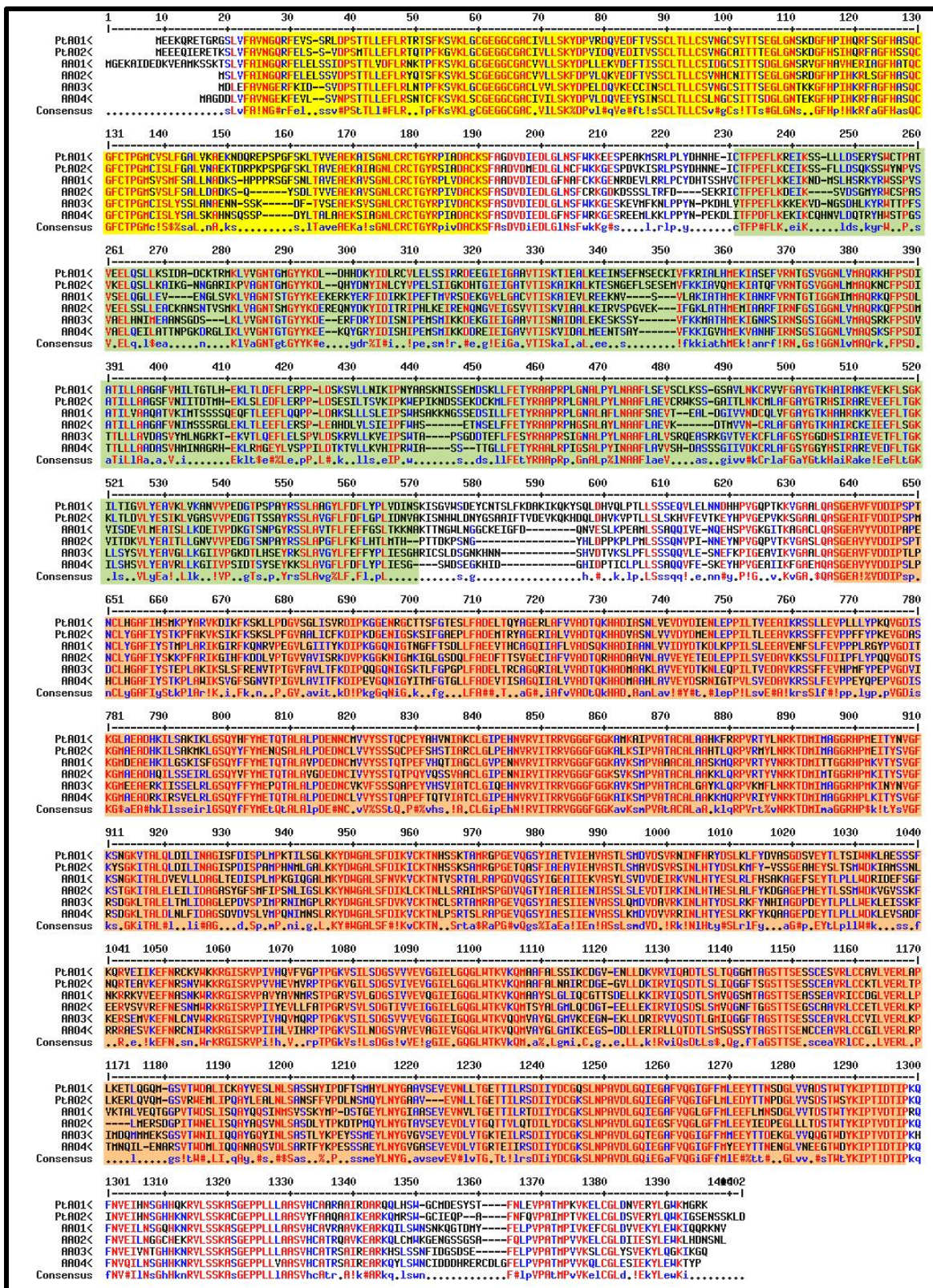


Abb. 12: Alignment der Proteinsequenzen der PtAO1 und PtAO2, sowie aller Arabidopsis AOs. Farblich hinterlegt sind die Bereiche des Fe-S-Clusters (gelb), der FAD-Domäne (grün) und der Moco/Dimerisierungs-Domäne (orange).

2.2 Etablierung der AO und XDH *in-gel*-Aktivitätsfärbung bei Populus

Koshiba et al. (1996) und Hesberg et al. (2004) beschreiben die Aktivitätsmessung der AO und XDH mittels eines *in-gel* Assays. Dabei wird der Rohextrakt durch eine native PAGE aufgetrennt und anschließend in einer Färbelösung inkubiert. Dieser Aktivitätsnachweis ist für krautige Pflanzen entwickelt worden und es handelt sich um keine etablierte Routine-methode. Insbesondere bei Pappel stellt sich dieser als schwer durchführbar dar. Mit einigen Modifikationen konnte der Assay jedoch für *P. x canescens* etabliert werden. Der Extraktionspuffer (100 mM KPP, 5 mM DTT, 2 mM EDTA) wurde auch für Pappel unverändert verwendet, jedoch erfolgten alle Zentrifugationsschritte bei 18.000 rpm anstelle 15.000 rpm. Diese wurden sofort wiederholt bis der Rohextrakt komplett frei von Bruchstücken war, denn Zellrückstände stören das *in-Gel*-Laufverhalten der Proben und die spätere Farbreaktion. Zusätzlich wurde nach dem ersten Zentrifugationsschritt ca. 15 mg Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) hinzugegeben, um die bei Pappel stark enthaltenen Polyphenole zu binden. Da es sich bei PVPP um einen unlöslichen Feststoff handelt, können die Polyphenole durch Zentrifugation abgetrennt werden. Des Weiteren ist es bei Pappel-Rohextrakt nötig anstelle von 80 µg 250 µg Proteinmenge auf das 7,5%ige Polyacrylamidgel zu laden, da sonst die Färbeintensität zu gering ist. Diese Erhöhung der Proteinmenge geht meist mit einer Mehrfachbeladung des Sammelgels einher.

Auf allen folgenden *in-gel* Aktivitätsfärbungen ist 80 µg *A. thaliana* Blattrohextrakt als interner Standard geladen, der eine Einschätzung der Qualität der Färbungen und einen Vergleich der verschiedenen Gele untereinander erlaubt.

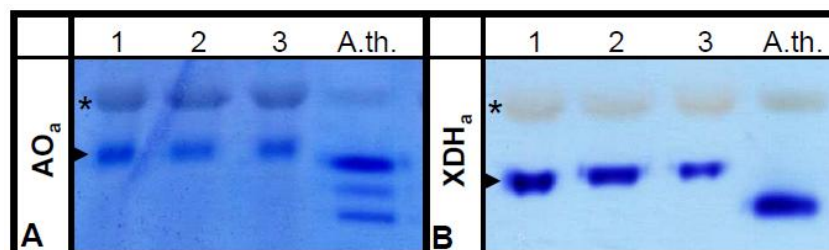


Abb. 13: AO- (A) und XDH-Aktivitätsfärbung (B) von unbehandeltem *P. x canescens* Wildtyp (WT) (1-3) und *A. thaliana* WT. Die Rohextrakte wurde mittels PAGE in einem 7,5%igem Trenngel getrennt und mit Indol-3-carboxaldehyd (A), sowie Xanthin und Hypoxanthin (B) gefärbt. Bei *A. thaliana* sind bei der AO-Färbung drei spezifische Banden zu sehen, wobei sich bei *P. x canescens* nur eine spezifische zeigt (Pfeil). Die mit (*) markierten Banden sind unspezifisch.

Während Arabidopsis drei spezifische AO-Banden- bei Verwendung von Indol-3-carboxaldehyd als Substrat- zeigt, ist bei Pappel nur eine zu beobachten (Abb. 13). Genau wie in Arabidopsis zeigt sich auch on Populus nur eine spezifische XDH-Bande. Sowohl bei der

AO- als auch bei der XDH-Färbung zeigt sich bei allen Proben eine Bande, die oberhalb der spezifischen Färbungen liegt. Diese ist unspezifisch und wird durch eine unbekannte Dehydrogenase verursacht (pers. Mitteilung F. Bittner; in Abb. 13 mit (*) markiert). Auch farblich unterscheidet sich diese Bande von den spezifischen Banden, da sie etwas heller ist. Für die spezifische XDH-Färbung wird bei dem Pappel-Assay Xanthin und Hypoxanthin verwendet.

2.3 Erzeugung und Charakterisierung transgener *P. x canescens*

Für die Untersuchung der Abscisinsäure (ABA) vermittelten Stressantwort in Pappel wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene transgene Pappeln benötigt, die genetische Modulationen an unterschiedlichen Stelle des ABA-Pathways besitzen. Dabei gibt es zwei Schwerpunkte: Zum einen die Aldehydoxidase (AO), die den finalen Schritt in der Biosynthese von ABA katalysiert. Es wurden knock down- (AO-RNAi), überexprimierende Pflanzen (AAO3), sowie ein AO-Promoter-GUS-Konstrukt (AO::GUS) erzeugt.

Den anderen Schwerpunkt stellt die Moco-Sulfurase ABA3 dar, die die AO aktiviert. Auch hier wurden knock down- (ABA3-RNAi), überexprimierende Pflanzen (GFP/ABA3) und ein ABA3-Promoter-GUS-Konstrukt (ABA3::GUS) erstellt.

All diese Konstrukte wurden stabil in *P. x canescens* transformiert. Nach der Klonierung der chimären Genkassetten wurden diese in die Multicloning-Site des Binärvektors pBIN19 und schließlich mittels Triple mating in *A. tumefaciens* eingebracht. Die Transformation fand mit mindestens 150 Internodien statt. Die Dauer der nachfolgenden aufwendigen Selektion und Regeneration von transgenen Pflanzen beträgt in der Regel ein Jahr.

2.3.1 AO-RNAi-Pflanzen

2.3.1.1 Konstrukterstellung

Aus genomischer DNA von *P. trichocarpa* wurde ein 410 bp Fragment der AO-Sequenz amplifiziert. Nach Subklonierung in pGEM®-T Easy (Promega) erfolgte die Überprüfung dieses Fragmentes mit Sequenzierung. Dabei zeigte sich, dass die ausgewählte Sequenz von der PtAO2 stammt, also diese vom RNAi-Effekt betroffen sein müsste. Das Fragment wurde in das existierende RNAi-Konstrukt aus Meyer et al. (2004) eingefügt, indem die GUS sense- und antisense-Fragmente mit diesem in der entsprechenden Orientierung ausgetauscht wurden, so dass das AO-RNAi-Konstrukt entstanden ist. Als Spacer diente das Intron 2 der Nitratreduktase aus Pappel mit einer Größe von 798 bp, das in den Untersuchungen von

Meyer (2003) von verschiedenen Spacern, die hinsichtlich ihrer Beteiligung am Gene silencing getestet wurden, den größten Erfolg zeigte.

2.3.1.2 Charakterisierung

Aus 44 verschiedenen Kalluslinien sind 113 Pflanzen regeneriert worden. Das Vorhandensein des Konstruktes wurde durch PCR-Analyse ermittelt. Der for-Primer bindet dabei im 35S-Promoter und der rev-Primer im Spacer-Bereich des RNAi-Konstrukts. Das erwartete Amplifikat von ca. 800 bp zeigte sich bei allen getesteten Pflanzen (Abb. 14).

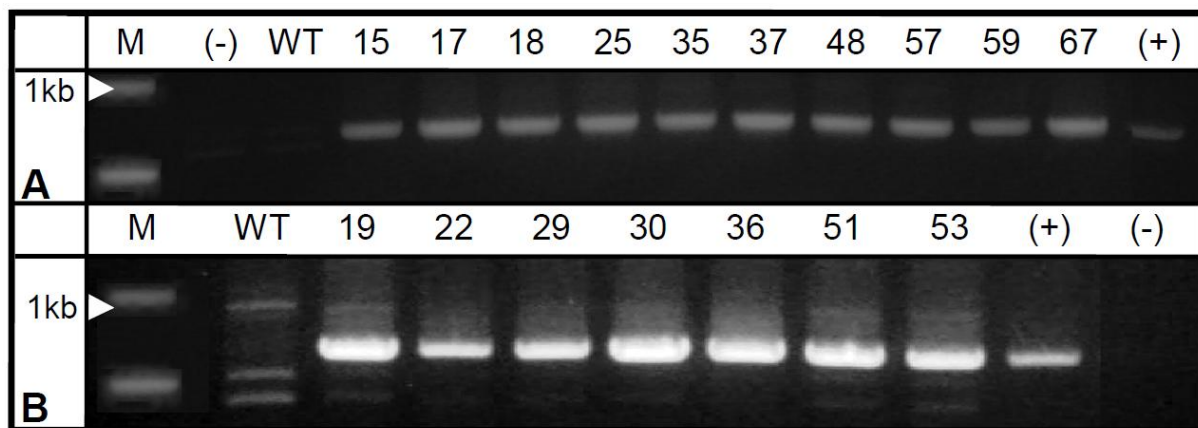


Abb. 14: PCR zum molekularen Nachweis der RNAi-Kassette in den transformierten AO-RNAi-Linien im 1%igem Agarosegel. Das gesuchte, ungefähr 800 bp große Fragment ist bei allen Pflanzen zu finden. M = Marker, (+) = Positiv-Kontrolle (NR-RNAi-Kassette in pCK mit Intron2), (-) = Wasser-Kontrolle, WT = Wildtyp

Da in diesen Pflanzen die Existenz des RNAi-Konstrukts nachgewiesen werden konnte, wurde der ABA-Gehalt im unbehandelten Zustand gemessen, um das Ausmaß des RNAi-Effektes zu bestimmen. Der WT-Gehalt wurde dabei gleich 100% und die ABA-Werte der potentiellen RNAi-Pflanzen dazu ins Verhältnis gesetzt. Es zeigten sich große Unterschiede, aber bei einigen Pflanzen betrug der ABA-Gehalt ungefähr 50% im Vergleich zum WT (Nr. 15, 17, 19, 22, 35 und 53) (Abb. 15) (Oelkers, 2007).

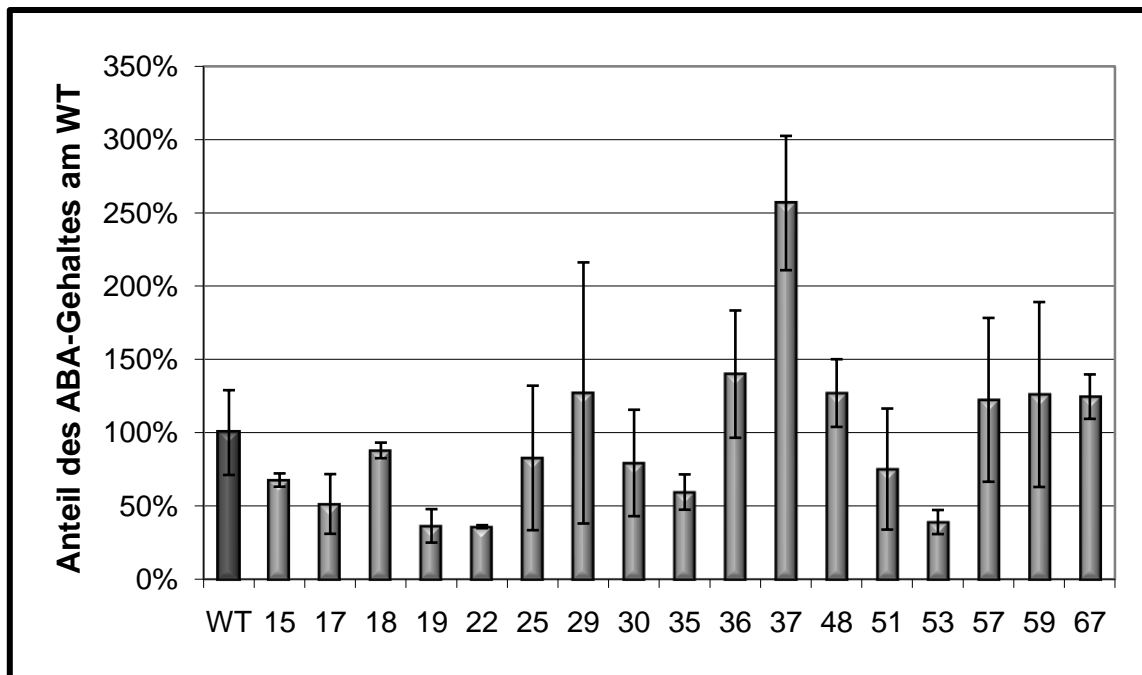


Abb. 15: Prozentuale Anteile der ABA-Gehalte der AO-RNAi-Pflanzen am Wildtyp (WT). Die Nummern 15, 17, 19, 22, 35 und 53 zeigen dabei eine Reduktion auf ungefähr 50% des WT-Gehaltes.

Bei der darauf folgenden Analyse der AO- und XDH-Aktivität war eine deutliche Verringerung der AO-Aktivität (Abb. 16 A) ohne Beeinflussung des Schwesterenzym XDH zu beobachten, denn hier ist eine starke Bande zu sehen (Abb. 16 B).

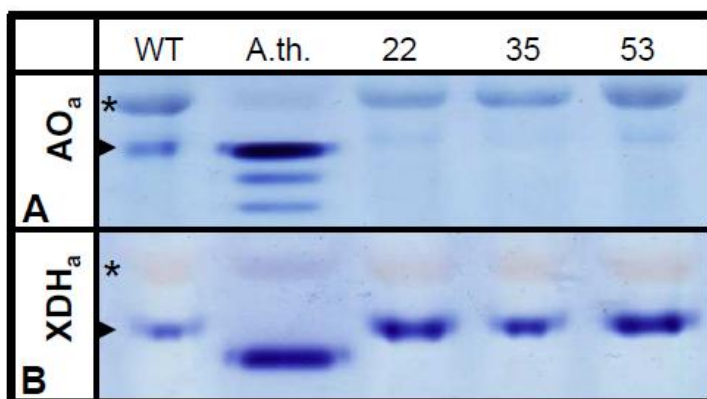


Abb. 16: Molekulare Analyse der AO-RNAi-Pflanzen. Die Aktivitätsfärbung der AO und XDH erfolgte im 7,5%igem nativen Trenngel nach PAGE unter der Verwendung der spezifischen Substrate. Die AO-Aktivität (A) ist bei den AO-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (WT) stark reduziert (Pfeil), wobei die XDH (Pfeil) keine Veränderungen im Vergleich zum WT aufweist (B). Die mit (*) markierten Banden zeigen die unspezifischen Banden.

Zum tatsächlichen Transkriptnachweis wurde eine RT-PCR durchgeführt (Hamisch, 2009). Hier konnten sowohl im Wildtyp also auch in den AO-RNAi-Pflanzen die *ptao2*-Transkripte gezeigt werden. Da die gleiche Menge cDNA in der PCR eingesetzt wurde, erscheint es so, dass das *ptao2*-Transkript in den AO-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist (Hamisch, 2009). Für eine eindeutige Aussage über die Quantität wäre eine semiquantitative PCR oder real time-PCR nötig (Abb. 53; Kap. 2.7 -Trockenstress).

In der Morphologie waren keine Abweichungen zum Wildtyp hinsichtlich Größe, Stammdurchmesser, Blattgröße und -gestalt zu beobachten. Um mögliche Unterschiede in der Stomatagröße und in der Anzahl pro Blattbereich zu erkennen, wurden PMMA-Abdrücke der unteren Epidermis angefertigt (Unold, 2010).

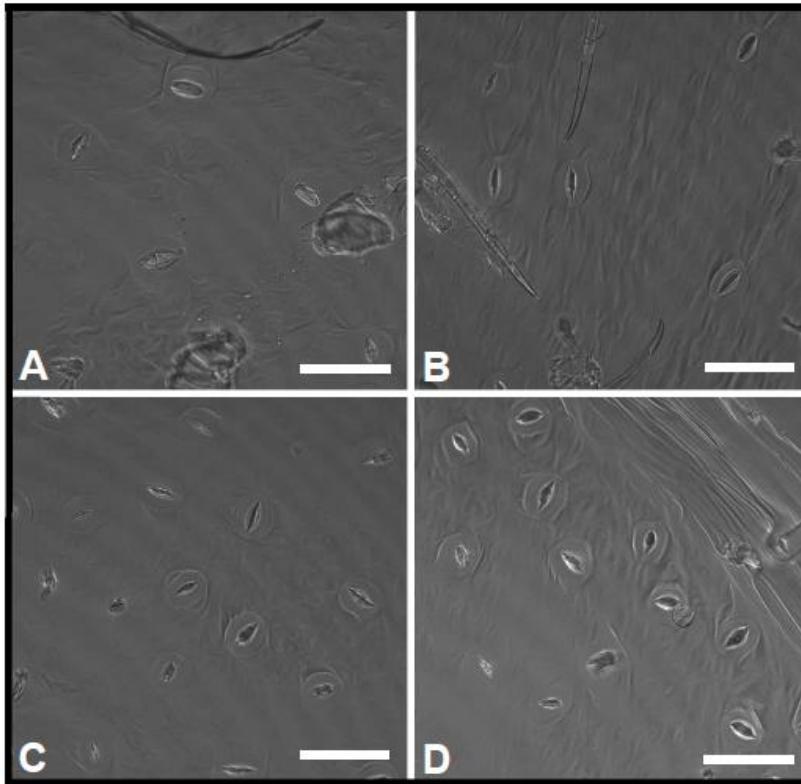


Abb. 17: PMMA-Abdrücke der AO-RNAi-Pflanzen. Gezeigt sind cLSM-Aufnahmen im Durchlichtkanal der erstellten PMMA-Abdrücke der unteren Epidermis von *P. x canescens* Wildtyp (WT) (A) und der AO-RNAi-Pflanzen Nr. 22 (B), 35 (C) und 53 (D) im unbehandelten Zustand. Der weiße Balken in den Bildern besitzt eine Größe von 50 μm .

In Abb. 17 sind die Aufnahmen der Abdrücke im Durchlichtkanal des cLSMs abgebildet. In (A) ist der WT und in (C) bis (D) die ausgewählten AO-RNAi-Pflanzen zu sehen. Auch hier zeigten sich keinerlei Unterschiede in der Größe und Anzahl der Stomata zum Wildtyp.

2.3.2 AAO3-Pflanzen

2.3.2.1 Konstrukterstellung

Für die Erzeugung eines Konstrukts zur Überexpression der AO wurde der 35S Promoter des cauliflower mosaic virus mit der full-length Arabidopsis AO3 (AAO3) cDNA und dem 35S Terminator fusioniert (F. Bittner, unveröffentlichte Daten). Die Isoform AAO3 wurde hierfür gewählt, da sie nach Seo et al. (2000b) die Oxidation von AB-Aldehyd katalysieren soll.

2.3.2.2 Charakterisierung

Die 33 erhaltenen Pflanzen stammen von 16 unabhängigen Kalluslinien. Die Existenz des Konstrukts wurde mit PCR ermittelt. Der for-Primer bindet dabei im 35S-Promoter und der

rev-Primer in der *aao3*-Sequenz. Das dabei entstehende Fragment mit einer Größe 966 bp ist bei allen getesteten transgenen Pflanzen zu finden (Abb. 18).

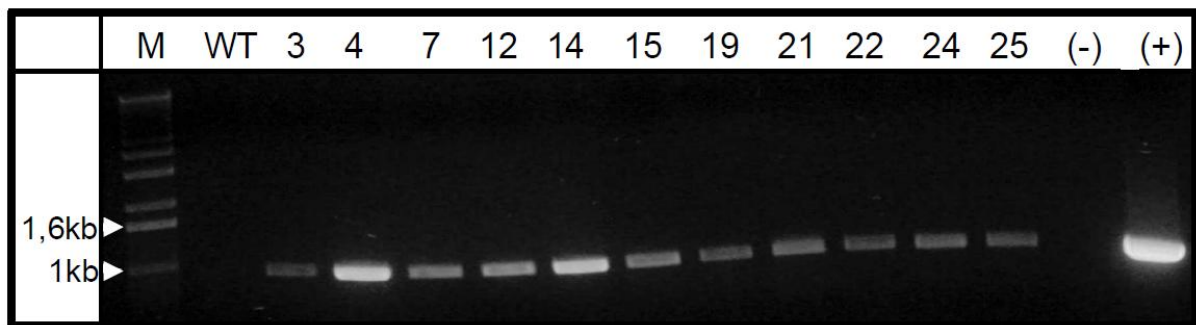


Abb. 18: PCR-Analyse zum Nachweis des AAO3-Konstrukts im 1%igen Agarosegel. Das erwartete Fragment von 966 bp ist bei allen Transgenen zu finden. M = Marker, (+) = Positiv-Kontrolle (isolierte Plasmid-DNA), (-) = Wasser-Kontrolle, WT = Wildtyp

Für die weitere Charakterisierung erfolgten Aktivitätsfärbungen und immunologische Nachweise mittels nativen Western Blot, um eine Aussage über die Expressionseffektivität des eingebrachten Konstrukts zu treffen. Dabei zeigten sich weder Unterschiede in den Aktivitäten von AO (Abb. 19 A) noch war eine stärkere Bande beim immunologischen Nachweis mit einem AAO1 Antikörper aus *A. thaliana* im Vergleich zum WT zu erkennen (Abb. 19 B). Allerdings war auch im Western Blot eine deutliche Bande (in Abb. 19 B mit (*) markiert) oberhalb der gesuchten spezifischen AO-Bande (Pfeil) zu sehen, was auf eine starke Proteinkonzentration an dieser Stelle schließen lässt. Wenn man die Höhe dieser starken Bande mit der der unspezifischen Dehydrogenasebande in der Aktivitätsfärbung vergleicht, ist zu erkennen, dass sie ungefähr auf derselben Höhe zu finden ist.

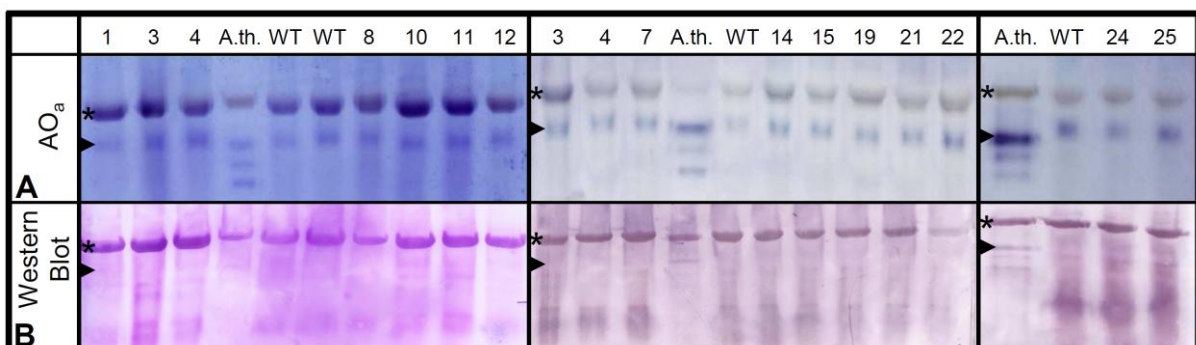


Abb. 19: AO-Aktivität (A) und immunologischer Nachweis mit dem AAO1 Antikörper (B) verschiedener putativer AAO3-Pflanzen und des Wildtyps (WT). Die Auftrennung des Rohextraktes erfolgte im 7,5%igem nativen Trenngel. Ein Gel wurde mit Indol-3-carboxaldehyd als Substrat gefärbt, das andere geblottet und mit dem AAO1 Antikörper behandelt. Die mit (*) markierte unspezifische Bande wird auch im Western Blot deutlich gefärbt.

Eine eindeutige Identifizierung von AAO3-Pflanzen, die eine hohe Transformationseffektivität besitzen, war mit den obigen Untersuchungsmethoden nicht möglich. Deshalb sollte mittels einer RT-PCR die tatsächliche AAO3-Expression in *P. x canescens* nachgewiesen werden (Abb. 20).

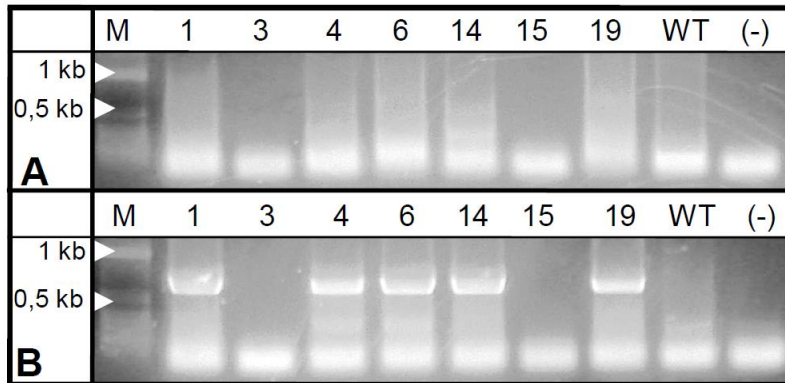


Abb. 20: aao3-Transkript-nachweis mittels RT-PCR. (A) zeigt die Überprüfung auf mögliche DNA-Verunreinigungen, die nicht festgestellt wurden. In (B) ist das Transkript der AAO3-Pflanzen gezeigt. Die Pflanzen Nr. 3 und 15 weisen keine Bande auf und sind so als AAO3-Überexprimierer auszuschließen. M=Marker, (-) = Wasser-Kontrolle, Wildtyp = WT

Bei solchen Nachweisen ist es unverzichtbar, die Amplifikation durch genomische DNA von der cDNA zu unterscheiden. Die einfachste Methode ist ein Fragment zu wählen, das in der genomischen DNA von einem oder mehreren Introns unterbrochen wird. Da diese bei Expression herausgeschnitten werden, unterscheiden sich Amplifikate der genomischen DNA und cDNA in ihrer Größe. Bei einem zusätzlich eingebrachten Konstrukt sind jedoch schon alle Introns eliminiert, so dass hier diese Unterscheidungsmethode nicht angewendet werden kann. Es wurden zwei verschiedene Amplifikationen mit der cDNA der putativen AAO3 Überexprimierer und des Wildtypen durchgeführt. Der Nachweis der tatsächlichen Expression erfolgte mit zwei Primern, die im AAO3-Gen binden. Da das AAO3-Konstrukt durch einen 35S-Promoter gesteuert wird, konnten eventuelle DNA Verunreinigungen mit einem anderen for-Primer, der im 35S-Promoter bindet, festgestellt werden. Da in Abb. 20 A keinerlei Banden zu erkennen sind, kann eine DNA-Verunreinigung der cDNAs der putativen AAO3-Pflanzen ausgeschlossen werden. Bei Amplifikation aus genomischer DNA wäre ein Fragment mit einer Größe von ca. 1,3 kb zu erwarten gewesen. Die Expression konnte in den Pflanzen Nr. 1, 4, 6, 14 und 19 nachgewiesen werden, da sich hier ein Bande mit der Größe von ca. 700 bp zeigte. Als Überexprimierer sind Nr. 3 und 15 auszuschließen (Hamisch, 2009).

In folgenden Analysen müssen weitere putative AAO3-Pflanzen hinsichtlich ihrer Expression getestet werden. Außerdem sollte eine Messung der ABA-Gehalte erfolgen.

2.3.3 AO-Promoter::GUS

2.3.3.1 Konstrukterstellung

Mit dem AO-RNAi-Konstrukt sollte die PtAO2 herunter reguliert werden. Aus diesem Grund wurde nach der Internetrecherche in der *P. trichocarpa* Datenbank (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html) ein ungefähr 1,5 kb großer Sequenzabschnitt upstream der PtAO2 ausgewählt und als Promoterbereich definiert. Die PtAO2-Sequenz liegt auf dem scaffold_66 von 491753 – 498766 bp und der Promoterbereich befindet sich auf demselben scaffold von 491696 – 491696 bp. Aus genomischer DNA von *P. x canescens* konnte durch eine nested PCR (Primer siehe Material und Methoden) ein 1,6 kb großes Fragment amplifiziert werden (Deppe, 2008). Nach erfolgreicher Sequenzierung (s. Anhang 6.4.2) wurde das Fragment in den pEntr-MCS eingebracht (Berthold, 2009; Hamisch, 2009). Mittels GATEWAY-Technologie erfolgte die Klonierung in den Binärvektor pKGWSF7 (Invitrogen). Nach Transformation in *A. tumefaciens* wurde das Konstrukt in *N. benthamiana* durch Infiltration getestet. Dabei zeigte sich eine deutliche GUS-Expression (Daten nicht gezeigt).

Da sich der Kallus zur Zeit der Verfassung der vorliegenden Arbeit noch in der Transformation befand, konnten keine Pflanzen hinsichtlich ihrer Transgenität oder in Stressexperimenten getestet werden.

2.3.4 ABA3-RNAi-Pflanzen

2.3.4.1 Konstrukterstellung

Aus genomischer DNA von *P. trichocarpa* wurden zwei Exone von ABA3 (LG_VII 7136650-7136823 (174 bp) und LG_VII 7137117-7137323 (207 bp)) in einer Fusions-PCR vereinigt. Zwischen diesen Exonen befindet sich ein Intron mit einer von Größe 268 bp. In einer ersten PCR wurden beide Exone mit dem zwischen ihnen liegenden Intron amplifiziert (Abb. 21 A). In der folgenden Fusions-PCR war nur ein Schatten des erwarteten Fragmentes mit einer ungefähren Größe von 400 bp zu erkennen (in Abb. 21 B mit (*) markiert), deshalb wurde eine zweite PCR nur mit den äußeren Primern der Fusions-PCR zur Fragmentvermehrung durchgeführt (Abb. 21 C).

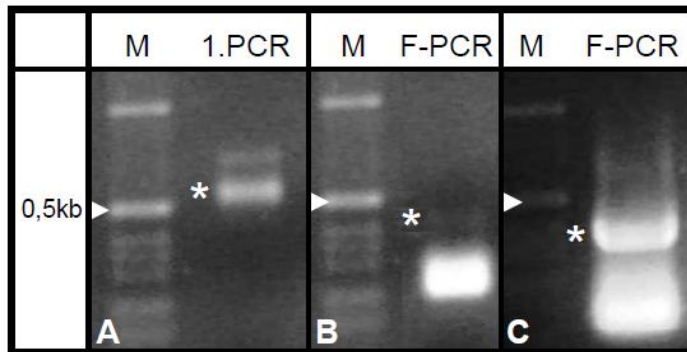


Abb. 21: Erstellung des ABA3-RNAi-Konstrukts mittels Fusions-PCR. In (A) ist die Amplifikation beider Exone mit dem sie trennenden Intron gezeigt. In (B) und (C) ist die Fusions-PCR (F-PCR) gezeigt. M = Marker, (*) = gesuchte Bande

Dieses Amplifikat diente als sense und in umgekehrter Orientierung als antisense Fragment. In dem bereits existierenden RNAi Konstrukt aus Meyer et al. (2004) wurden die GUS sense und antisense Fragmente ausgetauscht und so das ABA3-RNAi Konstrukt erstellt. Als Spacer diente das Intron 2 aus Pappel mit einer Größe von 798 bp. Der Nachweis der Richtigkeit erfolgte mittels Sequenzierung.

Auf Grund der Herkunft des Fragmentes aus *P. trichocarpa* erfolgt die Klonierung des Fragmentes auch aus *P. tremula*, um die Funktionalität des RNAi-Konstruktes in *P. x canescens*, dem Hybriden aus *P. alba* und *P. tremula*, zu analysieren. Der Sequenzvergleich ergab vier Unterschiede (Deppe, 2008).

2.3.4.1 Charakterisierung der transgenen Linien

Zur Charakterisierung wurden die verschiedenen regenerierten Pflanzen (insgesamt 128) aus 33 unterschiedlichen Kalluslinien zunächst auf die Existenz des RNAi-Konstrukts auf DNA-Ebene überprüft. Der for-Primer bindet im 35S-Promoter und der rev-Primer im Intron 2. Das erwartete Fragment von ca. 800 bp konnte bei mehreren Pflanzen amplifiziert werden, wobei die drei Pflanzen 4, 7 und 14 ausgewählt wurden, da sie von unterschiedlichen Linien stammen (Abb. 22 A).

Bisher existiert noch kein für ABA3 spezifischer Aktivitätsassay in Pappel. Aus diesem Grund wurden die Pflanzen hinsichtlich ihrer AO- und XDH Aktivität getestet, da ABA3 den Moco beider Enzyme gleichermaßen sulfuriert und sie dadurch in ihre aktive Form überführt. Bei erfolgreichem knock down-Effekt sollten diese Enzyme keine oder zumindest eine verringerte Aktivität zeigen. Nach der nativen PAGE folgte eine *in-gel* Färbung für die AO mit Indol-3-carboxaldehyd (Abb. 22 B) bzw. für die XDH mit Xanthin und Hypoxanthin (Abb. 22 C). Die bei der PCR als positiv identifizierten Pflanzen wiesen keinerlei Aktivität beider Enzyme auf trotz langer Inkubation in der Färbelösung, unter Verwendung von unbehandeltem *in-vitro* Material. Insgesamt konnte bei sieben von 33 verschiedenen Linien ein dramatischer Effekt auf die AO- und XDH-Aktivität festgestellt werden.

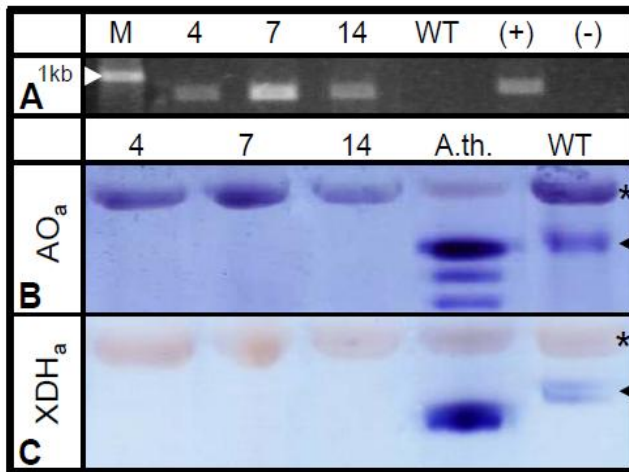


Abb. 22: Molekulare Analyse der ABA3-RNAi-Pflanzen. In (A) ist der Nachweis des RNAi-Fragmentes mittels PCR im 1%igen Agarosegel zu sehen. Das erwartete Fragment ist bei allen Transformanten zu finden. M=Marker, (+) = Positiv-Kontrolle (isolierte Plasmid-DNA), (-) = Wasser-Kontrolle. Die Aktivitätsfärbung der AO und XDH erfolgte im 7,5%igem nativen Trenngel nach PAGE unter der Verwendung der spezifischen Substrate. Die AO-Aktivität (B, Pfeil) ist bei den ABA3-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (WT) ebenso stark reduziert wie die XDH (C, Pfeil). Bei allen Pflanzen zeigen sich die unspezifischen Banden (*).

Auch die ABA-Gehalte dieser Pflanzen wurden im unbehandelten Zustand gemessen. Zusätzlich zu den ABA3-RNAi-Pflanzen 4, 7 und 14 wurden die Nummern 13, 37 und 39 getestet, die ebenfalls keine AO- und XDH- Aktivität aufwiesen. Zum Vergleich wurden auch Pflanzen mit Aktivität (Nr. 1 und 19) und zwei Wildtypen (Abb. 23) analysiert. Dabei zeigten sich große Unterschiede der ABA-Gehalte von 169 bis 1253 ng/g FG. Der Mittelwert betrug bei vorhandener AO 696,5 ± 491 ng/g FG und bei fehlender Aktivität 634,4 ± 292,8 ng/g FG. Demzufolge sind keine Unterschiede durch die fehlende AO-Aktivität beobachtbar. Durch die hohe Standardabweichung beider Mittelwerte wird deutlich, dass die starken Schwankungen an dieser Stelle nicht auf Einflüsse durch AO zurückzuführen sind.

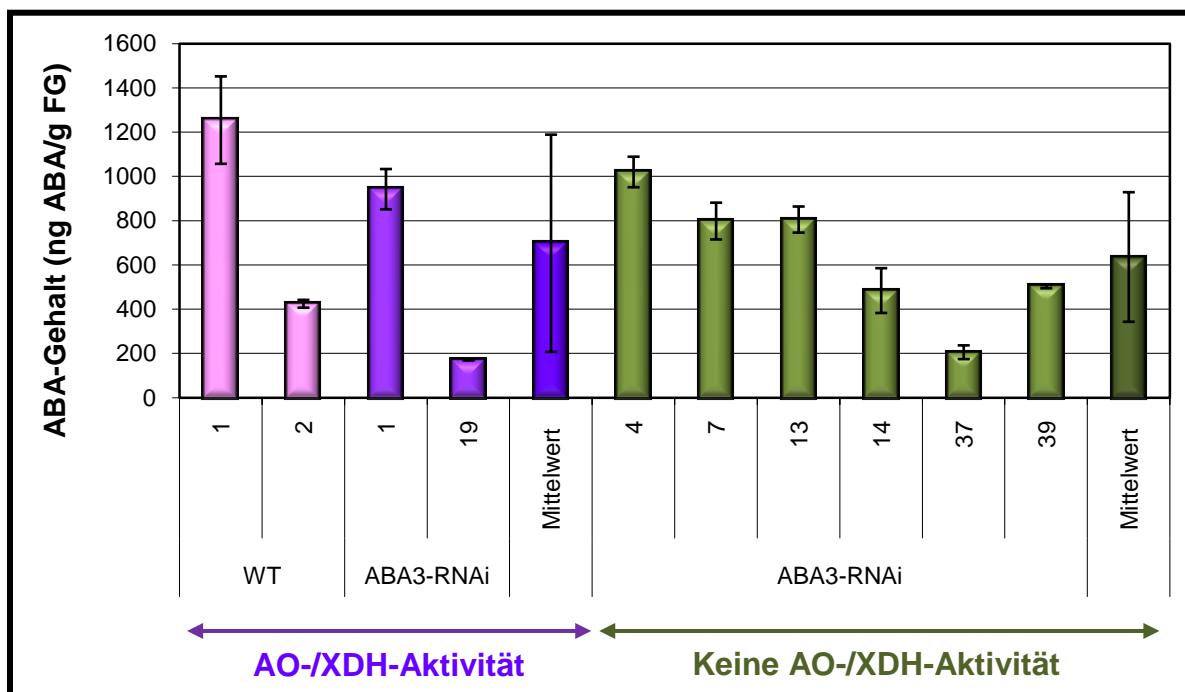


Abb. 23: ABA-Gehalte [ng/g FG] verschiedener ungestressster ABA3-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (WT). Auf der linken Seite sind die Konzentrationen der Pflanzen abgebildet, die AO- und XDH-Aktivität aufweisen und auf der rechten Seite diejenigen, die keinerlei Banden in der Färbung zeigen. Die Mittelwerte der Gehalte liegen bei Pflanzen mit und ohne Aktivität im gleichen Bereich.

Mittels einer RT-PCR sollte überprüft werden, ob das Transkript von ABA3 tatsächlich reduziert wurde. Die Primer binden dabei in zwei Exons, die von Introns getrennt werden, so dass es bei Amplifikation von genomischer DNA anstelle von cDNA zu einem Größenunterschied der Banden kommt. Das ABA3-Amplifikat besitzt in cDNA eine Größe von ca. 480 bp, in DNA hingegen 840 bp. In der cDNA des Wildtyps war eine Bande zu erkennen, die eine Größe von knapp 500 bp aufwies (Abb. 24). Hierbei handelt es sich demnach um das *aba3*-Transkript. Jedoch war dieses auch in den ABA3-RNAi-Pflanzen nachzuweisen, allerdings scheint es reduziert zu sein. Für die PCR sind gleiche Mengen an cDNA eingesetzt worden, so dass eine Bande von geringerer Intensität wahrscheinlich eine reduzierte Anzahl von Transkripten bedeutet (Hamisch, 2009). Jedoch ist für eine eindeutige Abschätzung der Transkriptmengen entweder eine semiquantitative oder real time PCR nötig. Die DNA-Kontrolle zeigt die Amplifikation des ABA3-Fragmentes mit Introns.

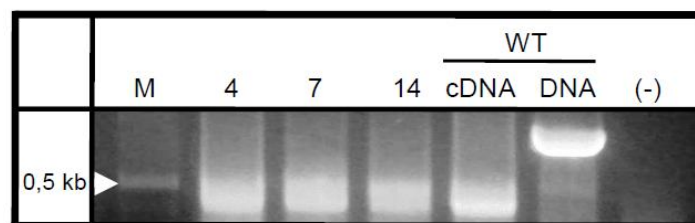


Abb. 24: *aba3*-Transkriptnachweis in den ABA3-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (WT). Gezeigt ist die Amplifikation der cDNA der ABA3-RNAi-Pflanzen im Vergleich zur WT cDNA und genomischer DNA. Das erwartete Fragment aus cDNA besitzt eine Größe von ca. 480 bp und aus genomischer DNA ca. 840 bp.

Morphologisch waren keinerlei Unterschiede zwischen den ABA3-RNAi-Pflanzen und den Wildtypen betreffend der Größe, Stammdurchmesser, Blattgröße und -gestalt erkennbar.

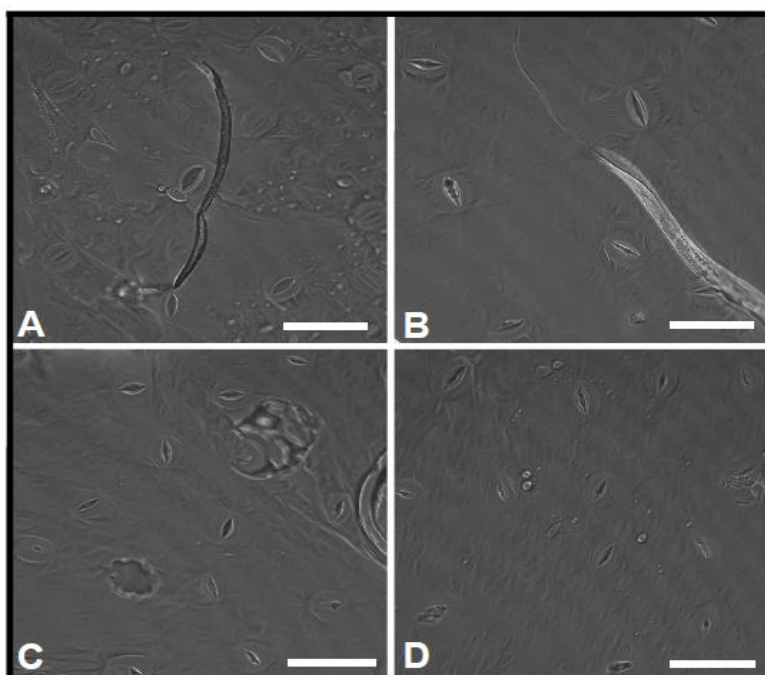


Abb. 25: PMMA-Abdrücke der ABA3-RNAi-Pflanzen. Gezeigt sind cLSM-Aufnahmen im Durchlichtkanal der erstellten PMMA-Abdrücke der unteren Epidermis von *P. x canescens* Wildtyp (WT) (A) und der ABA3-RNAi-Pflanzen Nr. 4 (B), 7 (C) und 14 (D) im unbehandelten Zustand. Der weiße Balken in den Bildern besitzt eine Größe von 50 µm.

In Abb. 25 sind PMMA-Abdrücke der unteren Epidermis im Durchlichtkanal der cLSM-Aufnahmen zu sehen. In (A) ist der WT und in (C) bis (D) die ABA3 knock downs abgebildet. In der Spaltöffnungsgröße und Anzahl pro Blattbereich sind keine Unterschiede festzustellen.

2.3.5 GFP/ABA3-Pflanzen

2.3.5.1 Konstrukterstellung

Für die Erstellung des GFP-ABA3-Fusionskonstrukts wurde der 35S-Promoter des cauliflower mosaic virus mit GFP (Aminosäuren 1-247 laut GenBank Eintrag AAB08058) fusioniert. Dahinter erfolgte die Klonierung der full-length Arabidopsis *aba3* cDNA und des 35S-Terminators (F. Bittner, unveröffentlichte Daten). Die Expression dieses Konstrukts führt zur Überexpression von ABA3 in der Pflanze.

2.3.5.2 Charakterisierung

Es sind 53 Pflanzen von sieben unterschiedlichen Kalluslinien hinsichtlich ihres Transformationserfolges getestet worden. Dabei wurden drei Pflanzen unterschiedlicher Kalluslinien ausgewählt (6, 14b und 28).

Mittels PCR ist auf DNA-Ebene das Vorhandensein des Fragmentes nachgewiesen worden. Der for-Primer bindet im 35S-Promoter und der rev-Primer in der GFP-Sequenz, wobei ein Fragment von 672 bp entsteht. Eine Bande dieser Größe wurde bei den drei ausgewählten Pflanzen gefunden (Abb. 26 A).

Die Expression des Konstrukts wurde mittels cLSM und Western Blot analysiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit zwei unterschiedlichen Antikörpern: einem Anti-GFP- (Abb. 26 B) und Anti-ABA3-Antikörper gegen das Arabidopsis-Protein (Abb. 26 C). Bei beiden Blots ist eine Bande bei 117 kDa bei den Pflanzen 6, 14b und 28 zu erkennen, die das Fusionsprodukt aus 90 kDa ABA3 und 27 kDa GFP darstellt.

Hinsichtlich der AO- und XDH-Aktivität zeigte eine Überexpression von ABA3 im unbehandelten Zustand keinen Unterschied zum WT (Abb. 26 D, E).

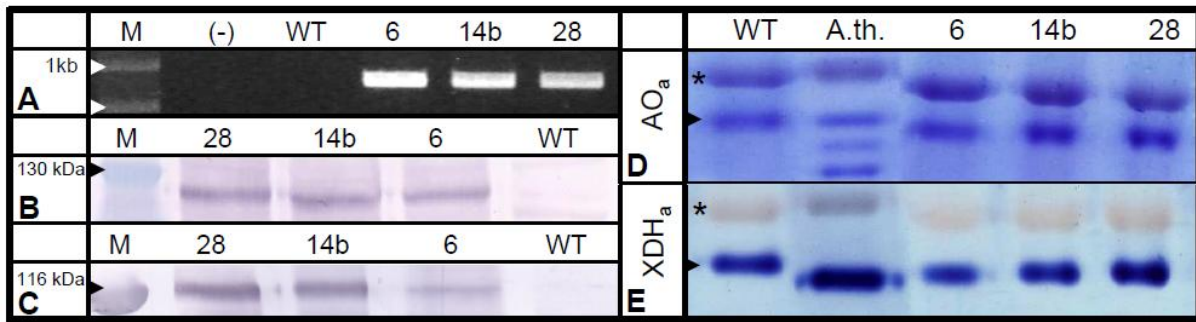


Abb. 26: Molekulare Analyse der ABA3 überexprimierenden Pflanzen. In (A) ist der Nachweis des Fragmentes mittels PCR im 1%igen Agarosegel zu sehen. Das erwartete Fragment ist bei allen ausgewählten Transformanten zu finden. M = Marker, (-) = Wasser-Kontrolle. Der immunologische Nachweis erfolgt mit zwei unterschiedlichen Antikörpern. Zum einen wurde ein GFP- (B) und zum anderen ein ABA3-Antikörper gegen das Arabidopsis-Protein (C) verwendet. In beiden Fällen zeigte sich die erwartete 117 kDa Bande. Die Aktivitätsfärbung der AO und XDH erfolgte im 7,5%igem nativen Trenngel nach PAGE unter der Verwendung der spezifischen Substrate. Die AO- (D, Pfeil) und XDH-Aktivität (E, Pfeil) ist bei den GFP/ABA3-Pflanzen ebenso stark wie beim Wildtyp (WT). Bei allen Pflanzen zeigen sich die unspezifischen Banden (*).

Bei allen drei Linien konnte mit Hilfe von mikroskopischen Aufnahmen eine GFP-Fluoreszenz im Cytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 27 A, B, C). Im Lambda Mode zeigte sich die für GFP spezifische Emission bei 515 nm (Abb. 27 D, E, F).

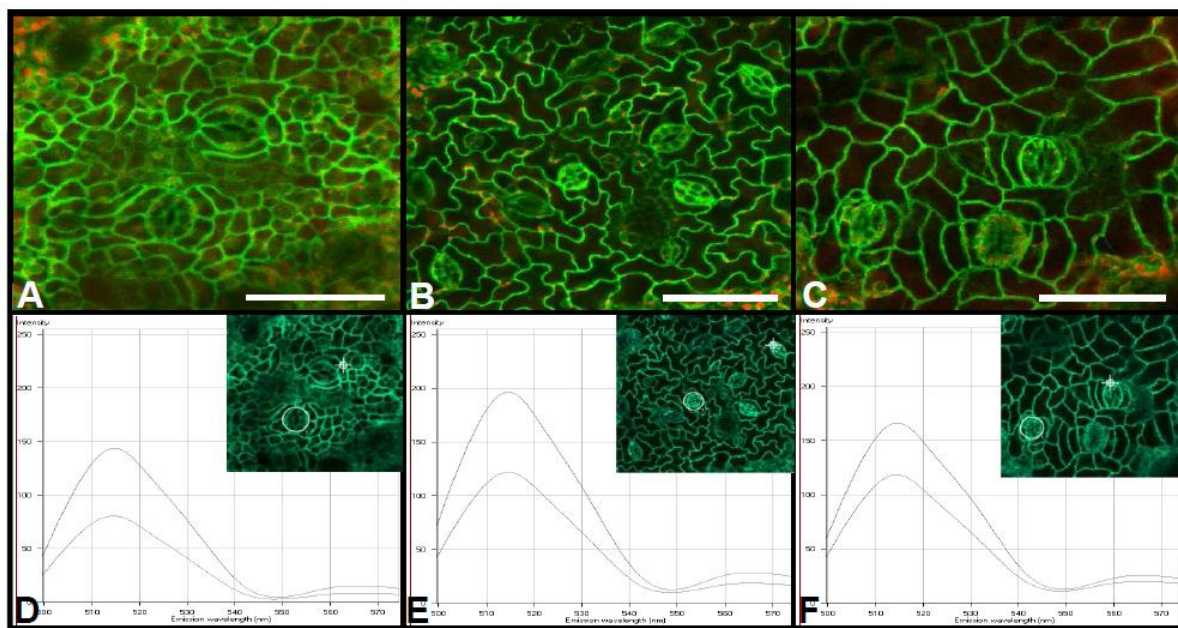


Abb. 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP/ABA3 Nr. 6, 14b und 28. In der oberen Reihe sind die Channel-Aufnahmen der GFP-Fluoreszenz der GFP/ABA3-Pflanzen Nr. 6 (A), Nr. 14b (B) und Nr. 28 (C) zu sehen. Der weiße Balken in den Aufnahmen stellt 50 µm dar. Es zeigt sich bei allen Pflanzen eine cytoplasmatische Lokalisierung des GFP/ABA3-Fusionskonstruktes. In der unteren Reihe erfolgt der Nachweis der Emission von GFP bei 515 nm von Nr. 6 (D), Nr. 14b (E) und Nr. 28 (F).

Die Fluoreszenz ist in allen Epidermiszellen sowie den Spaltöffnungen von sehr jungen, sich entwickelnden Blättern zu finden. Im Gegensatz dazu ist GFP in älteren, schon voll entwickelten Blättern nur in den Stomata nachweisbar. Dies ist exemplarisch an Nr. 14b gezeigt (Abb. 28).

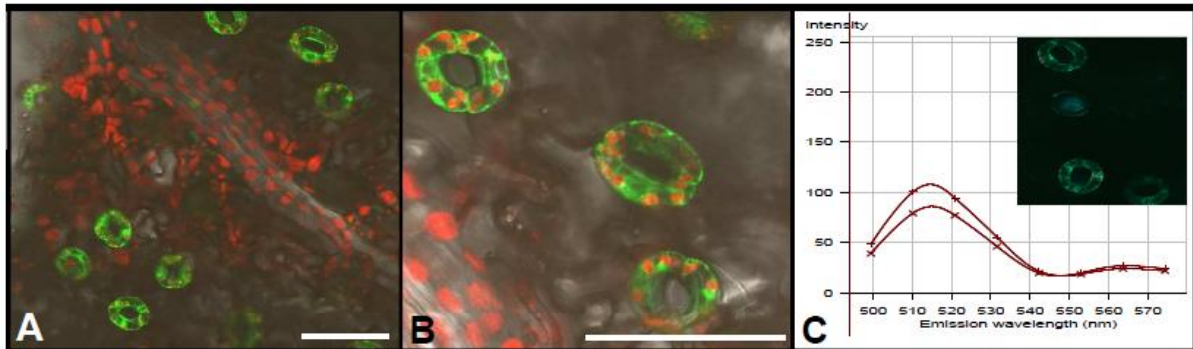


Abb. 28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP/ABA3 Nr. 14b. In (A) und (B) sind die Channel-Aufnahmen der GFP Fluoreszenz zu sehen. (B) stellt dabei den vergrößerten Bereich aus (A) (rechte obere Ecke) dar. In (C) ist das zugehörige Emissionsspektrum abgebildet.

Die ABA-Werte der unbehandelten transgenen *P. x canescens* betragen ungefähr 350 bis 450 ng/g FG (Abb. 29) und liegen damit im Bereich des Wildtyps mit 300 ng/g FG. Ein Unterschied im ABA-Gehalt durch die Überexpression von ABA3 ist demnach nicht erkennbar.

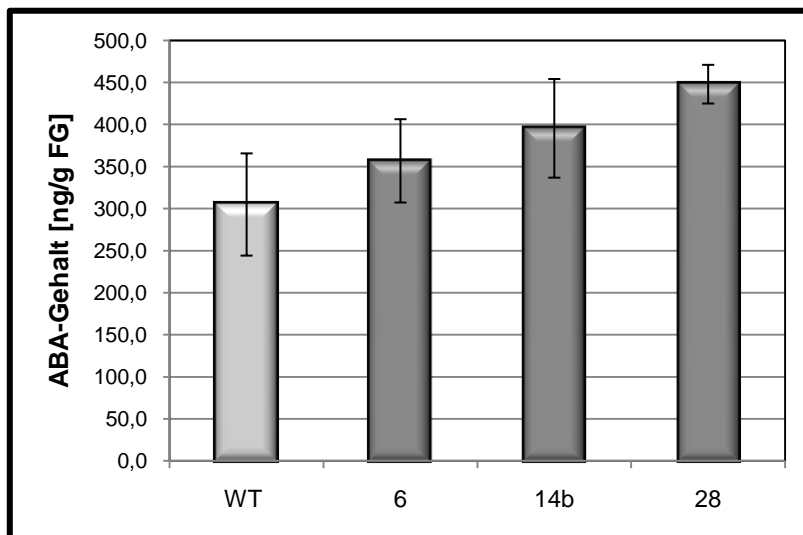


Abb. 29: ABA-Gehalte [ng/g FG] verschiedener unbehandelter GFP/ABA3-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (WT). Die Gehalte der Transgenen und des Wildtyps liegen im gleichen Bereich.

Weiterhin sind keinerlei morphologische Abweichungen zum Wildtyp hinsichtlich der Größe, Stammdurchmesser, Blattgröße und -gestalt feststellbar.

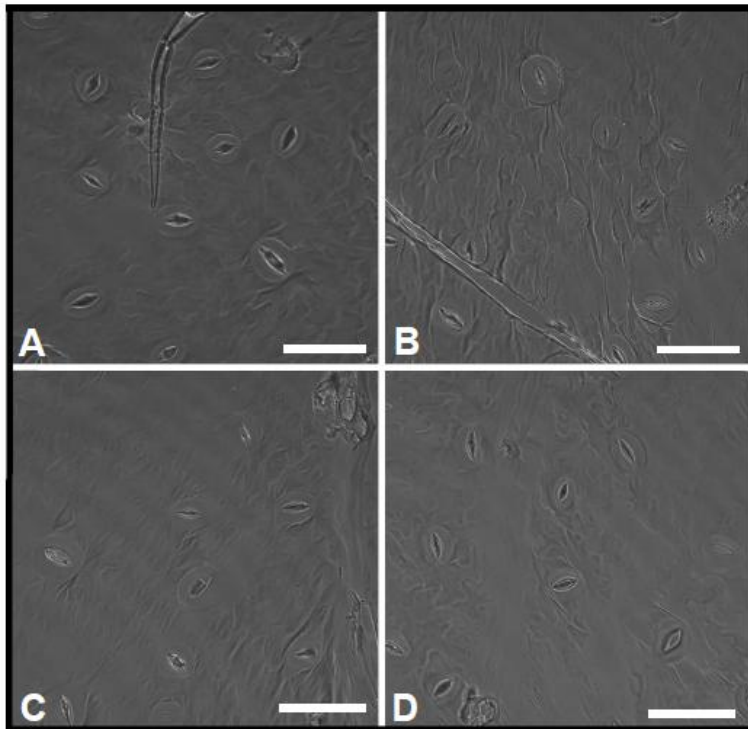


Abb. 30: PMMA-Abdrücke der GFP/ABA3-Pflanzen. Gezeigt sind cLSM-Aufnahmen im Durchlichtkanal der erstellten PMMA-Abdrücke der unteren Epidermis von *P. x canescens* Wildtyp (WT) (A) und der ABA3-Überexprimierern Nr. 6 (B), 14b (C) und 28 (D) im unbehandelten Zustand. Der weiße Balken in den Bildern besitzt eine Größe von 50 µm.

Es wurden PMMA-Abdrücke der unteren Epidermis angefertigt. Bei den cLSM-Aufnahmen sind die Stomata zu erkennen (Abb. 30). Im Vergleich zum Wildtyp (A) weisen die ABA3-Überexprimierer in (B) bis (D) hinsichtlich der Größe und Anzahl pro Blattbereich der Spaltöffnungen keine Unterschiede auf (Unold, 2010).

2.3.6 ABA3-Promoter::GUS

2.3.6.1 Konstruktherstellung

Der ABA3-Promoter wurde als ungefähr 1 kb großes Fragment upstream der *aba3*-Sequenz (LG VII 7128235 – 7138368 bp) definiert und nach der Internetrecherche in der *P. trichocarpa* Datenbank (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html) ausgewählt. Diese Sequenz liegt auf dem LG VII von 7127987 – 7128212 bp. Mit Hilfe einer nested PCR konnte ein 1,09 kb großes Fragment amplifiziert werden. Die Klonierung in den Vektor pRT99GUS (Töpfer et al., 1988) erfolgte durch Austauschen des 35S-Promoters (Kuchernig, 2007).

2.3.6.2 Charakterisierung

Die 50 regenerierten ABA3::GUS-Pflanzen aus 11 Kalluslinien wurden hinsichtlich ihrer GUS-Expression getestet. Die Pflanzen Nr. 8, 16, 27 und 50 zeigten dabei die höchsten Werte in einem einmaligen Test der verschiedenen Pflanzen (Abb. 31). Für die weiteren

Untersuchungen wurden die Nr. 8, 27 und 50 ausgewählt. Die Nr. 16 wurden trotz ihres, im Vergleich zu den anderen Pflanzen, hohen GUS-Wertes nichtgenutzt, da dies aus derselben Kalluslinie stammt wie Nr. 8.

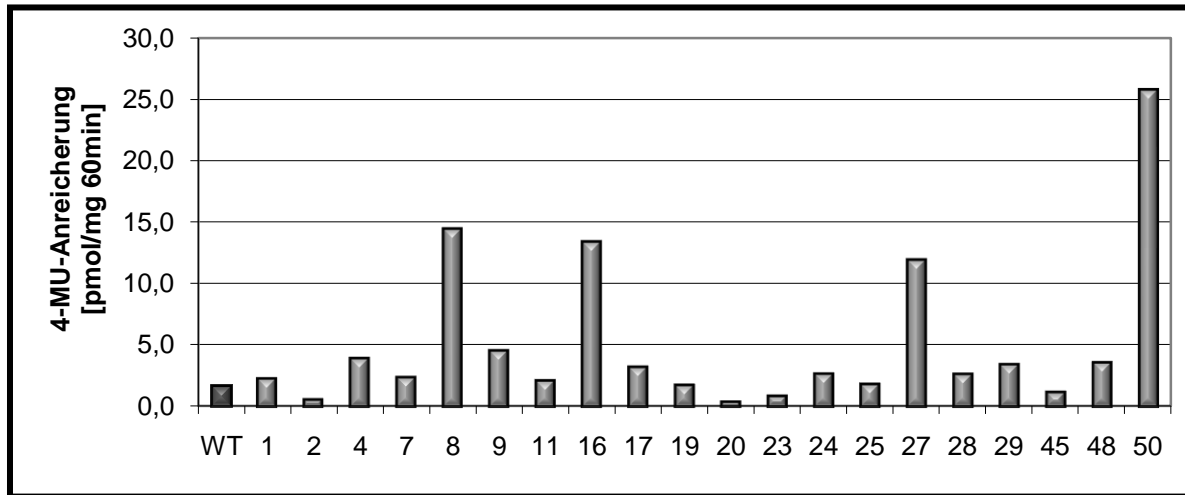


Abb. 31: GUS-Expression der ABA3::GUS-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (WT). Die GUS-Aktivität ist angegeben in 4-MU-Anreicherung in pmol pro mg Protein und 60 min. Die höchste Expression ist bei Nr. 8, 16, 27 und 50 zu finden.

Die Pflanzen wurden auch auf die Existenz des ABA3-Promoter::GUS-Konstrukts im Genom mittels PCR überprüft. Der for-Primer bindet im ABA3-Promoter und der rev-Primer im *gusA*-Gen (*E. coli*). Das dabei entstehende Fragment besitzt eine Größe von 929 bp und konnte bei den ausgewählten Pflanzen 8, 27 und 50 nachgewiesen werden (Abb. 32).



Abb. 32: PCR-Nachweis auf die Existenz des ABA3::GUS-Fragmentes im 1%igem Agarosegel. Gezeigt sind die ABA3::GUS-Pflanzen 8, 27 und 50, sowie ein Wildtyp (WT). M = Marker, (+) = Positiv-Kontrolle (isolierte Plasmid-DNA), (-) = Wasser-Kontrolle

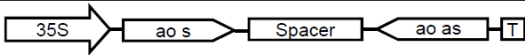
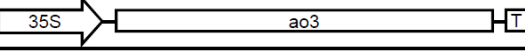
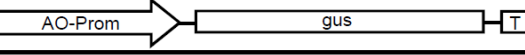
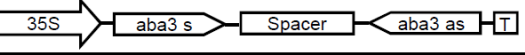
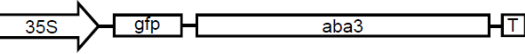
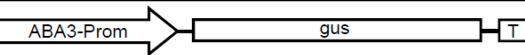
2.3.7 Zusammenfassung der erzeugten *P. x canescens*

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene transgene Pappeln erzeugt werden, die eine Modifikation im ABA-Biosyntheseweg aufweisen. Die AO betreffend stehen AO knock down- und AAO3 überexprimierende Pflanzen zur Verfügung. Das AO-Promoter-Konstrukt befand sich zur Zeit der Anfertigung dieser Arbeit noch in der Transformation, so dass es nicht für Induktionsstudien zur Verfügung stand.

Außerdem konnten Transformanten, die auf den AO- und XDH-Aktivator ABA3 Einfluss nehmen, hergestellt werden. Für folgende Untersuchung sind ABA3 knock down- und ABA3 überexprimierende Pflanzen, sowie ein Promoter-GUS-Konstrukt für Induktionsstudien vorhanden.

Die erstellten Konstrukte sind in der folgenden Tabelle mit den ausgewählten Pflanzenlinien dargestellt (Tab. 7).

Tab. 7: Erzeugte transgene *P. x canescens*.

Konstrukt (Benennung und Schema)	Transformierte Internodien	Gesamtanzahl		Ausgewählte Pflanzenlinien	
		Kallus	Pflanzen	Ursprungs-Kallus	Pflanze Nr.
AO-RNAi		44	113	2-2	22
				2-13	35
				2-3	53
AAO3		16	37	i.A.	i.A.
AO::GUS		i.T.	i.T.	i.T.	i.T.
ABA3-RNAi		33	128	6-24	4
				1-1	7
				1-7	14
GFP/aba3		7	53	4-14	6
				4-3	14b
				3-13	28
ABA3::GUS		11	50	2-8	8
				1-5	27
				2b-6	50

Legende: In der Tabelle ist die Anzahl der transformierten Internodien, der Kalluslinien und regenerierten Pflanzenaufgeführt. In den beiden letzten Spalten ist die Nummer der in der Arbeit verwendeten Pflanzen sowie ihre Zuordnung zum Ursprungskallus zu finden. i.A.=in Analyse, i.T.=in Transformation

Die in Tab. 7 aufgeführten Pflanzen stehen nun zur Verfügung und sind in den folgenden Abschnitten intensiv in Stressexperimenten untersucht worden.

2.4 Allopurinol-Hemmung der Populus-XDH

Die AO und die XDH sind als Schwesternenzyme eng verwandt und deshalb stellte sich die Frage, ob die beiden Enzyme sich ergänzen und die Funktion des anderen teilweise übernehmen können. Aus diesem Grund sollte die XDH in bestimmten Stresssituationen inhibiert werden, um die alleinige Auswirkung auf die AO-Aktivität zu testen. Allopurinol ist in der Literatur als äußerst spezifischer XDH-Hemmer beschrieben. Da diese Substanz im lebenden Organismus wirken sollte, wurde es in das Medium der *in-vitro*-Pflanzen (Wildtyp, AO-RNAi, GFP/ABA3) gegeben.

Bei der ersten Zugabe war im XDH-Aktivitätsgel überraschenderweise eine Steigerung der Aktivität zu beobachten. Um dieses Ergebnis zu reproduzieren, sollte eine mehrfache Zugabe von Allopurinol erfolgen. Auf diese Weise sollte eine konstante Allopurinol-Konzentration innerhalb der Pflanze gewährleistet werden, so dass kein ausreichender Abbau durch die pflanzeigenen Enzyme geschehen und auch neu exprimierte Enzyme der XDH gehemmt werden konnten. Die zeitliche Abfolge und Konzentrationen der drei Ansätze sind in Abb. 33 (A) zu finden. Das Ernten der Proben erfolgte immer 20 h nach der letzten Zugabe. In Abb. 33 (B und C) sind die AO- und XDH-Aktivitäten der mehrfachen Allopurinol-Zugabe zu finden. Hier wurden zwei verschiedene Wildtypansätze der verschiedenen Allopurinol-Zeitpunkte vergleichend aufgetragen. In Abb. 33 (B) ist zu sehen, dass sich die AO-Aktivitäten der verschiedenen Behandlungen nicht unterscheiden, also Allopurinol keinen Einfluss auf die AO ausübt. Bei Allopurinol-Zugabe wird die XDH jedoch beeinflusst, hier kommt es zu einer massiven Induktion, denn die Bandenintensität ist drastisch erhöht (Abb. 33 C).

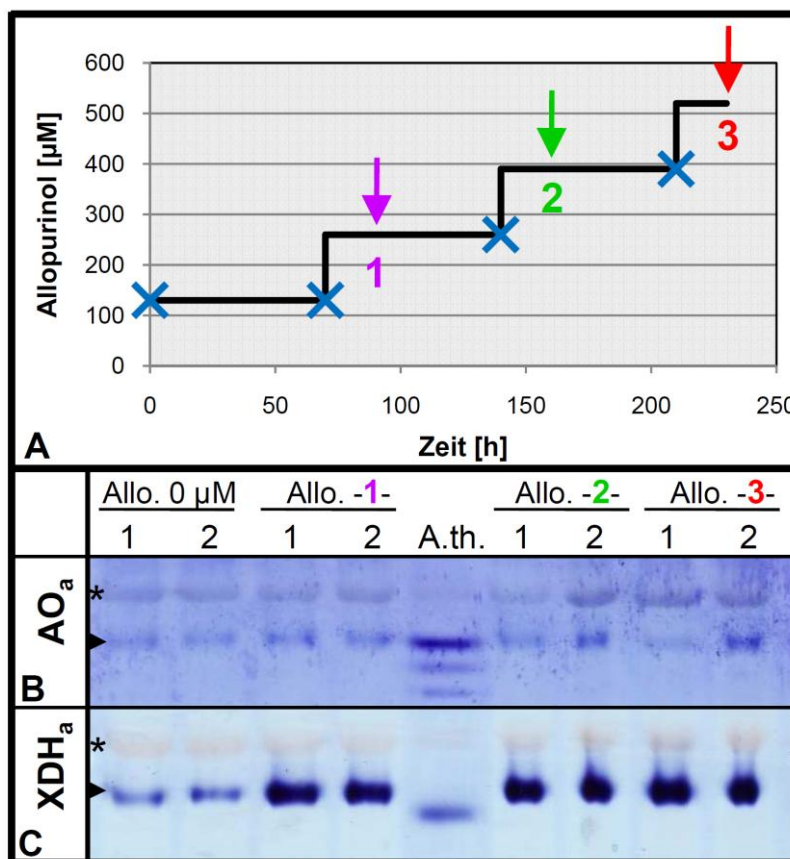


Abb. 33: AO- (B) und XDH-Aktivitäten (C) der Allopurinol-Zugabe ins Medium (A). In (A) ist der Verlauf der Allopurinol-Zugabe graphisch dargestellt. Die Zugabe von 130 μ M Allopurinol (blaues Kreuz) erfolgte immer nach 70 h. Die Pflanzen wurden 20 h nach der zweiten (lila), dritten (grün) bzw. vierten (rot) Zugabe geerntet. Auf den Gelen sind zwei unterschiedliche Wildtypen (1 und 2) der Kontrolle (0 μ M Allopurinol) und der drei Ansätze (1, 2, 3) im Vergleich zu sehen. Die mit (*) markierten Banden zeigen die unspezifischen Banden. Allo. = Allopurinol

Dieses Verhalten konnte bei allen getesteten Pflanzen beobachtet werden. Dies ist beim Vergleich des Wildtyps mit den AO knock down- und den ABA3-Überexprimierern zu sehen, denn alle Proben zeigen eine vergleichbare Bandenintensität beim Allopurinol-Ansatz 1 (Abb. 34).

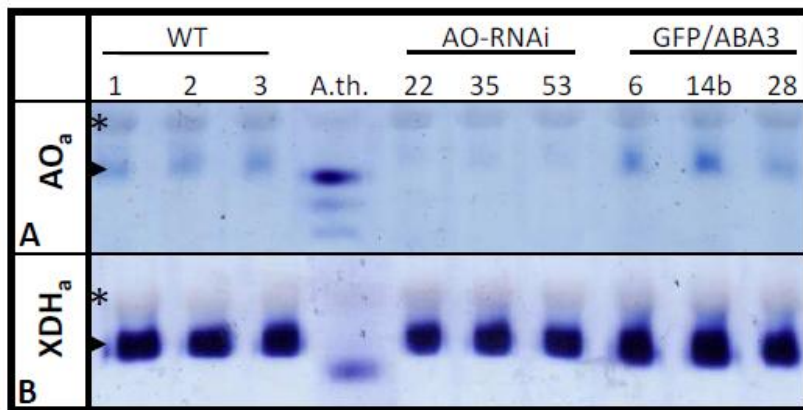


Abb. 34: AO- (A) und XDH-Aktivitäten (B) des Allopurinol Erntezeitpunkts -1- ins Medium. Auf den Gelen sind die Wildtypen (WT) vergleichend mit den AO-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen aufgetragen. Die entsprechenden Mengen und Inkubationszeiten mit Allopurinol sind in Abb. 33 (A) zu finden. Die mit (*) markierten Banden zeigen die unspezifischen Banden.

Auf Grund der nicht nachweisbaren Inhibition der XDH durch Allopurinol, stellte sich die Frage der Sensitivität der Populus-XDH auf diese Substanz. Deshalb wurde Allopurinol direkt in die Färbelösung gegeben, so dass es die XDH unverändert erreicht. Dazu wurden unbehandelter und mit 200 μ M Allopurinol versetzter Wildtyp und als Referenz *A. thaliana* mit den XDH-Substraten gefärbt. Nach der nativen PAGE wurden drei Gelabschnitte erzeugt. Der erste Abschnitt wurde in Färbelösung ohne Allopurinol gegeben (Abb. 35 A), der zweite wurde mit 2,5 mM (Abb. 35 B) und der dritte mit 4,2 mM Allopurinol gefärbt (Abb. 35 C). Bei 4,2 mM handelt es sich um die Löslichkeitsgrenze von Allopurinol und 2.5 mM wurde nach persönlicher Mitteilung von F. Bittner gewählt. In Abb. 35 (B) und (C) ist eine abnehmende Bandenintensität aller drei Proben zu beobachten, was auf eine Sensitivität der XDH auf Allopurinol hinweist.

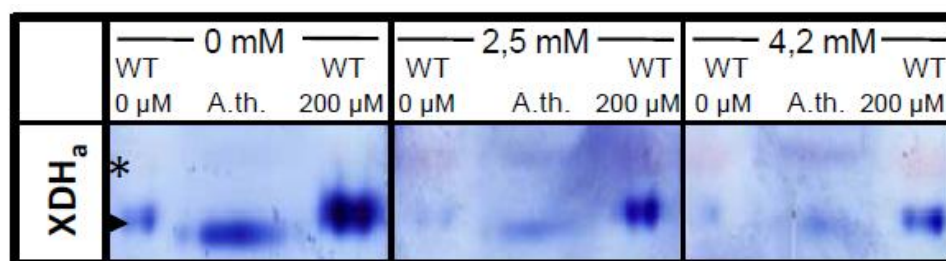


Abb. 35: XDH-Aktivität mit Allopurinol in der Färbelösung. In (A) ist die Färbelösung ohne, in (B) mit 2,5 mM und in (C) mit 4,2 mM Allopurinol zu sehen. Aufgetragen wurde unbehandelter und mit 200 μ M Allopurinol versetzter Wildtyp (WT) und *A. thaliana* (A.th.) als Referenz. (*) markiert die unspezifische Banden.

Da die XDH eine Induktion durch Allopurinol-Zugabe ins Medium zeigte, sollte auch der ABA-Gehalt von diesen Proben bestimmt werden. Obwohl bei der AO keinerlei Reaktion auf den Inhibitor erkennbar war, sollte trotzdem zur Überprüfung der Gehalt analysiert werden, da eine AO unterstützende Funktion der XDH denkbar wäre (Abb. 36).

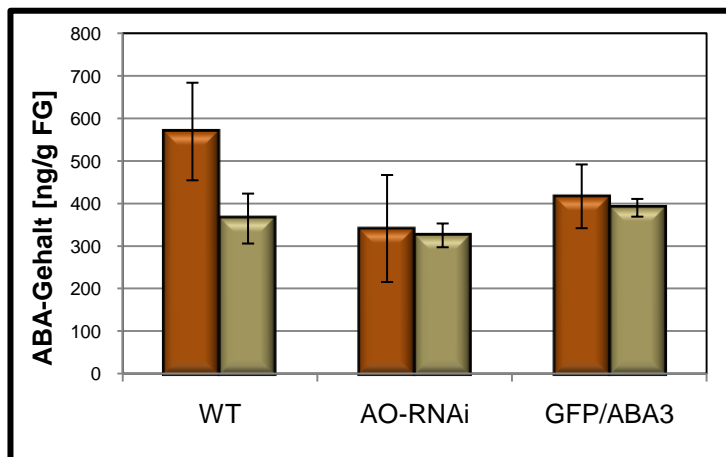


Abb. 36: ABA-Gehalt der Allopurinol-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle [ng pro g FG]. Die Werte der Wildtypen (WT), AO-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen wurden gemittelt. Die braune Säule stellt die Kontrolle und die olivgrüne die Allopurinol-Behandlung dar.

Die ABA-Gehalte verändern sich durch die Allopurinol-Behandlung bei den AO knock downs und den ABA3-Überexprimierern nicht, beim Wildtyp sinkt der Wert leicht. Dies liegt wahrscheinlich im normalen Schwankungsbereich, der bei der ABA-Bestimmung meistens zu beobachten ist.

2.5 Effekte von ABA-Applikation auf die transgenen Pappeln

Der Einfluss von ABA auf die AO und XDH sollte bei den transgenen Linien analysiert werden. Da es sich bei ABA um das Produkt der AO handelt, sind Rückkopplungsprozesse denkbar, die die Aktivität der AO und möglicherweise auch ihres Schwesterenzym XDH beeinflussen. Es erfolgten zwei verschiedene ABA-Zugaben, um dies zu untersuchen. Im ersten Ansatz wurde ABA ins Medium von *in-vitro* Pflanzen gegeben, so dass die Aufnahme über die Wurzeln erfolgt. Im zweiten Versuch wurden Blätter von Hydroponik-Kulturen mit ABA besprüht. Die Auswirkungen der Zugabe von ABA ins Medium auf die AO- und XDH-Aktivität ist in Abb. 37 zu sehen. Hier sind drei verschiedene Wildtyp-Ansätze aufgetragen: Kontrolle, 50 und 100 μ M ABA. Hinsichtlich der AO (Abb. 37 A) sind keine Aktivitätsunterschiede durch eine ABA-Applikation erkennbar. Die XDH zeigt eine hohe Aktivität, aber diese ist auch in der Kontrolle (0 μ M) sichtbar. Ein leichter Aktivitätsanstieg ist bei 100 μ M zu beobachten.

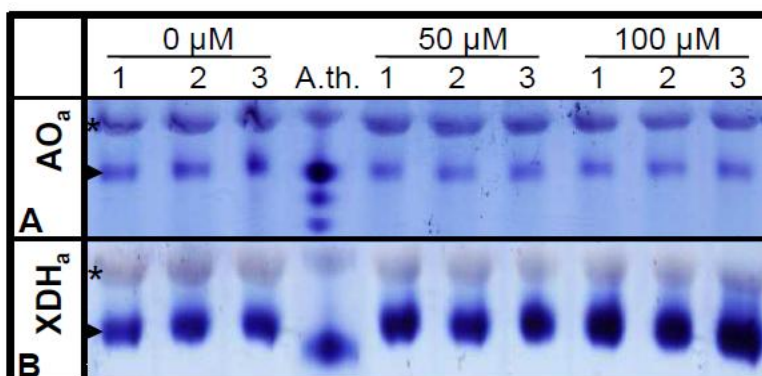


Abb. 37: AO- (A) und XDH-Aktivitäten (B) bei ABA-Applikation ins Medium. Aufgetragen sind drei verschiedene Wildtyp-Ansätze (1-3), in deren Medium jeweils 0 μ M, 50 μ M und 100 μ M gegeben wurde. (*) markiert die unspezifischen Banden.

Das Sprühen von ABA von 100 und 200 μM ergab ebenfalls keinerlei Aktivitätsunterschiede zwischen der Kontrolle und den behandelten Proben zu sehen. Dies gilt nicht nur für den Wildtyp, sondern auch für die AO knock downs und den ABA3-Überexprimierern (s. Anhang 6.6).

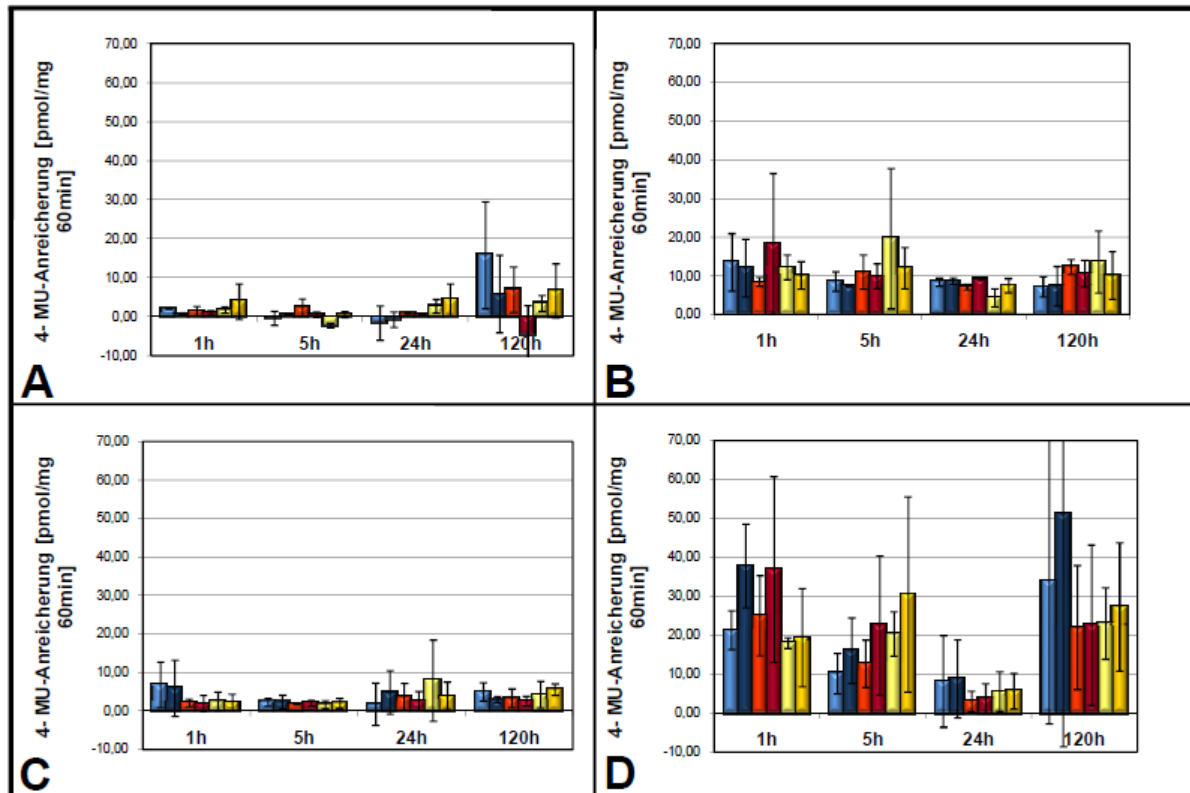


Abb. 38: ABA3-Promoter – Veränderung der GUS-Expression durch ABA-Applikation. Eine Blatthälfte des Wildtyps (A) sowie der ABA3::GUS-Linien Nr. 8 (B), 27 (C) und 50 (D) wurden mit 100 (blau), 200 (rot) und 400 mM (gelb) behandelt. Die GUS-Expression in 4-MU-Anreicherung [pmol pro mg Protein und 60 min] wurde nach 1, 5, 24 und 120 h analysiert. Als Kontrolle (hellblau, hellrot und hellgelb) wurde die andere Blatthälfte verwendet, die mit Wasser feuchtgehalten wurde, so dass Verwundungsreaktionen in beiden Blatthälften gleichermaßen vorkommen.

Für Induktionsstudien wurden Blätter der ausgewählten ABA3::GUS-Pflanzen Nr. 8, 27 und 50 beidseits der Mittelrippe geteilt. Die eine Hälfte wurde unbehandelt in eine Petrischale mit feuchtem Filterpapier gelegt, die andere wurde zuerst mit 100, 200 bzw. 400 mM ABA an der Blattunterseite besprüht und anschließend auch in einer befeuchteten Petrischale inkubiert. Nach 1, 5, 24 und 120 h wurde die GUS-Aktivität gemessen, um den Einfluss von ABA auf die Expression zu bestimmen (Unold, 2010). Eine signifikante Induktion bzw. Repression des ABA3-Promoters ist nicht zu beobachten. Bei ABA3::GUS Nr. 8 sind zwar eine leichte Induktion nach 1 h bei 200 mM und einer Repression nach 5 h und 400 mM zu beobachten, aber auf Grund fast identische GUS-Werte zwischen den Kontrollen und den behandelten Proben zu verzeichnen. Jedoch sind die Standardabweichungen so groß, dass hier insgesamt von keiner Reaktion des ABA3-Promoters auf ABA ausgegangen werden kann. Dies ist auch bei Pflanze Nr. 27 zu sehen, deren Kontroll- und ABA-Applikationswerte nahezu gleich sind.

ABA3::GUS Nr. 50 zeigt in fast allen Behandlungen eine Repression, doch auch dies ist nicht signifikant. Zusammenfassend zeigt der ABA3-Promoter demnach keinerlei Reaktion auf ABA-Applikation.

2.6 Effekte von Salzstress auf die transgenen Pappeln

Das Phytohormon ABA spielt bei osmotischen Stressantworten eine große Rolle, wobei die Frage der Regulation der Biosynthese bei Pappel unbekannt ist. Aus diesem Grund wurde NaCl-Applikationen der Wildtypen und der in 3.3 beschriebenen Transformanten mit *in-vitro*-Pflanzen durchgeführt.

Die eingesetzten Konzentrationen variierten dabei zwischen 50 und 200 mM, der Versuchszeitraum betrug zwischen 16 und 69 h. Hochkonzentrierte NaCl-Lösungen wurden dabei in das *in-vitro* Medium gegeben, so dass die Aufnahme des Salzes durch die Wurzeln erfolgte. In den ersten Versuchen fehlen die ABA3-RNAi-Pflanzen, da sie erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung standen.

2.6.1 NaCl-Applikation für 66 und 44 Stunden

Wildtyp- (1, 2, 3), AO-RNAi (22, 35, 53)- und ABA3 überexprimierende Pflanzen (6, 14b, 28) wurden für fast drei Tage (66 h) den Konzentrationen 100, 200 und 300 mM NaCl ausgesetzt. Eine gleichmäßige Reaktion aller Pflanzen auf das Salz war zu beobachten. Dies ist beispielhaft am Wildtyp in Abb. 39 zu sehen. Zu der Kontrolle (Abb. 39 A) wurde Wasser gegeben und sie zeigt einen normalen Phänotyp. Nach 66 h mit 50 mM NaCl (Abb. 39 B) wies der Wildtyp welke Blätter auf.

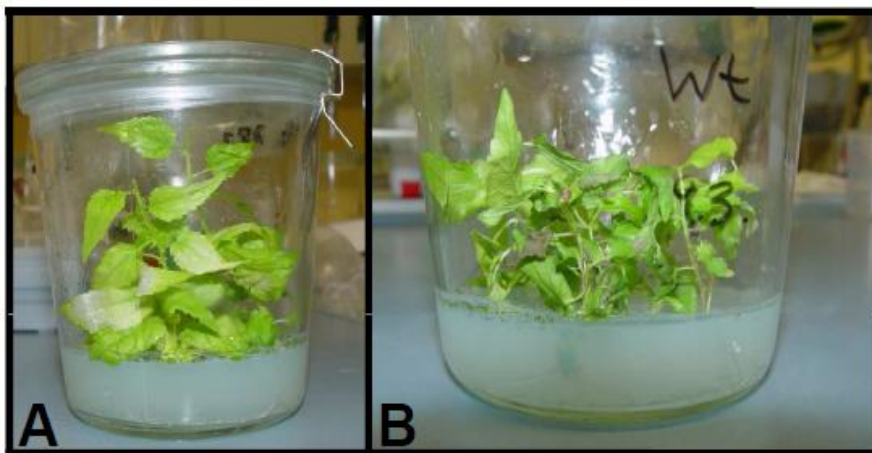


Abb. 39: Auswirkungen der NaCl-Applikation auf die osmotische Stabilität der Wildtyp-Blätter. In (A) ist die Kontrolle zu sehen und (B) zeigt den WT nach 66 h mit 50 mM NaCl.

Die Rohextrakte der Pflanzen wurden auf ihre AO und XDH-Aktivität getestet. Dabei zeigte sich eine ungefähr gleiche AO-Aktivität in allen Behandlungen und der Kontrolle (Abb. 40 A). Ein minimaler Anstieg ist bei 100 mM zu beobachten. Stärkere XDH-Banden waren bei 100 mM NaCl im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Es ist also eine Aktivitätserhöhung zu beobachten, ebenso wie bei 200 mM (Abb. 40 B). Die AO-RNAi-Extrakte wiesen nur eine sehr schwache AO-Aktivität, aber eine mit dem Wildtyp vergleichbare XDH-Aktivität auf.

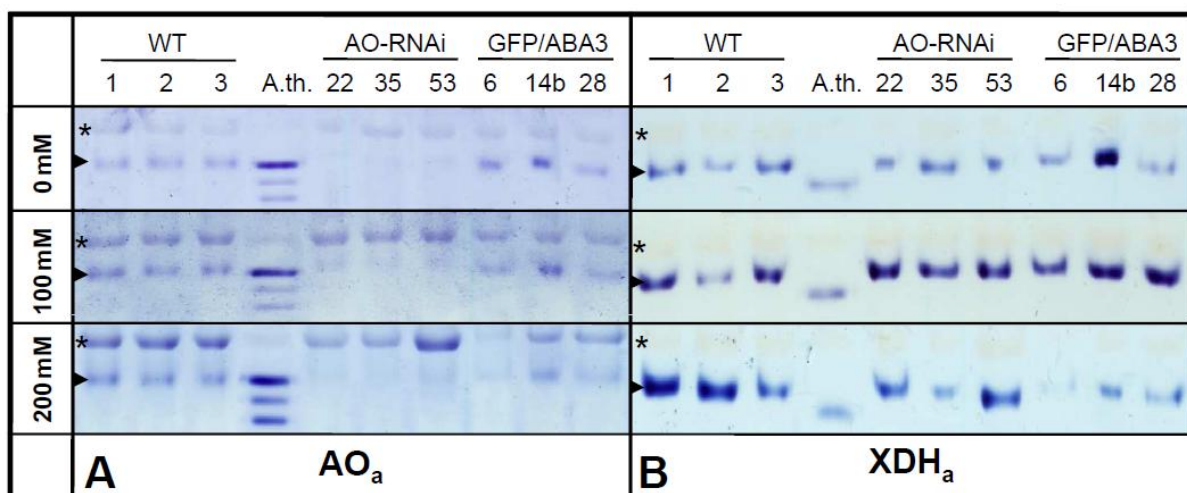


Abb. 40: NaCl-Stress für 66 h. Wildtyp (WT 1, 2, 3)-, AO-RNAi (22, 35, 53) und GFP/ABA3-Pflanzen (6, 14b, 28) wurden den Konzentrationen 100 und 200 mM ausgesetzt. Als 0 mM Kontrolle wurde ddH₂O zugegeben. Nach einer nativen PAGE zeigt sich im 7,5%igen Trenngel eine annähernd gleiche AO-Aktivität (A) und eine durch den Stress erhöhte XDH-Aktivität (B). Bei allen Pflanzen sind die unspezifischen Banden (*) zu sehen.

Eine Erhöhung der ABA-Gehalte konnte trotz gleich bleibender AO-Aktivität gemessen werden. Die ABA Konzentration stieg bei 100 mM um das 3,8 fache und bei 200 mM um das 4,8 fache. Obwohl die AO-RNAi-Pflanzen eine sehr geringe AO-Aktivität aufweisen, ist mit Erhöhungen von 1,7 und 2,1 eine deutliche Veränderung der ABA-Gehalte festzustellen. Auch bei den ABA3-Überexprimierer sind deutliche Anstiege um das 2,7 und 2,4 fache (Abb. 41) zu beobachten.

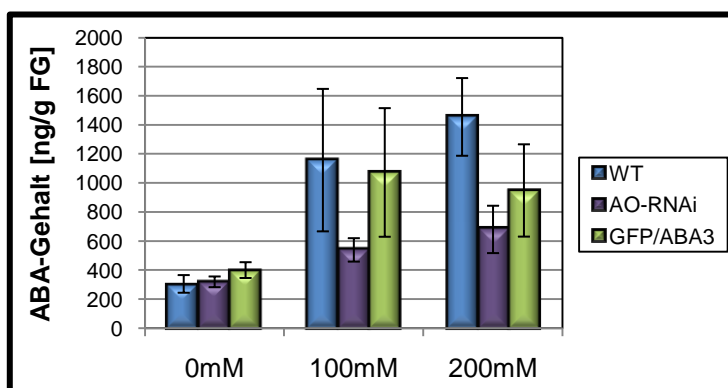


Abb. 41: ABA-Gehalte des NaCl-Stresses für 66 h in ng pro FG. Die zugehörigen Aktivitäten sind in Abb. 40 zu sehen. Die Werte der Wildtypen (WT), AO-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen wurden gemittelt.

In einem erneuten Stressansatz wurden die Konzentrationen und die Dauer der NaCl-Behandlung reduziert. Es wurden 50, 100 und 150 mM für 44 h zugegeben. In diesem Versuch erfolgte die alleinige Betrachtung der Aktivitäten.

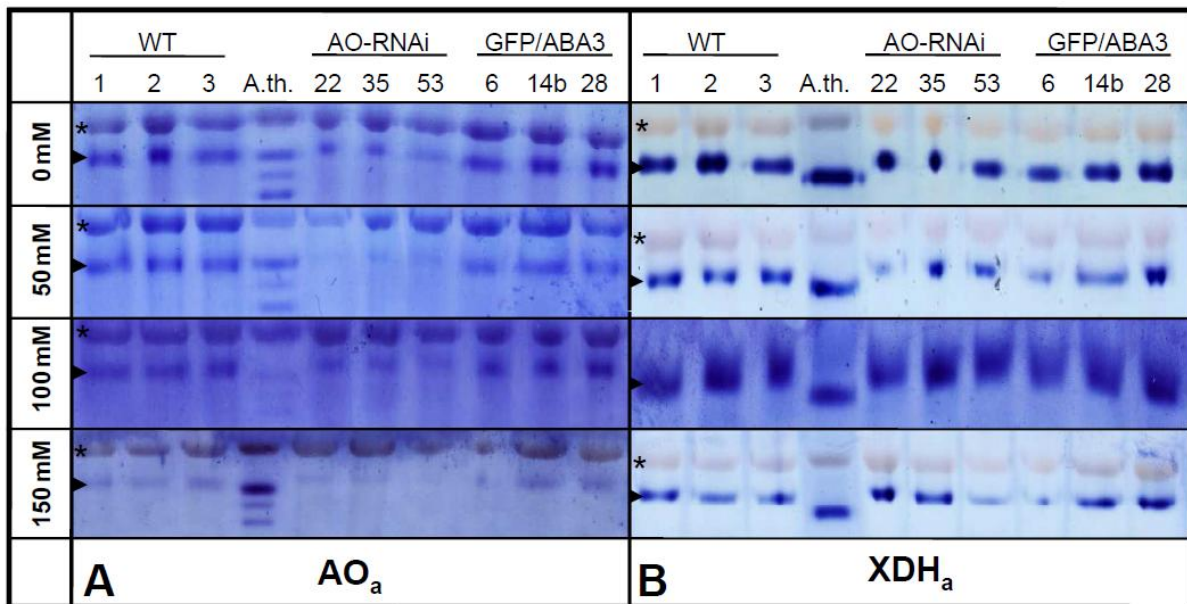


Abb. 42: NaCl-Stress für 44 h. Wildtyp (WT 1, 2, 3), AO-RNAi- (22, 35, 53) und GFP/ABA3-Pflanzen (6, 14b, 28) wurden den Konzentrationen 50, 100 und 150 mM ausgesetzt. Als Kontrolle (0 mM) wurde ddH₂O zugegeben. Nach PAGE zeigt sich im 7,5%igen Trenngel eine annähernd gleiche AO- (A) und XDH-Aktivität (B). Bei allen Pflanzen sind die unspezifischen Banden (*) zu sehen.

Es waren erneut keine Veränderungen der AO-Banden unter den unterschiedlichen Behandlungen (Abb. 42 A) zu beobachten. Auch die XDH zeigt keinerlei Abweichungen zu den Kontrollaktivitäten (Abb. 42 B). Jedoch sind bei beiden Enzymen die Färbungen bei sehr hohen Konzentrationen wie 150 und 200 mM deutlich schwächer als die Kontrolle mit 0 mM (Abb. 40, Abb. 42). Auffällig ist die teilweise doch recht starke AO-Färbung der AO-RNAi-Pflanzen wie bei 0 und 100 mM.

2.6.2 NaCl-Applikation für 16 Stunden

Die längeren Stresse von 66 und 44 h weisen keine Veränderung der Enzymaktivitäten. Deshalb sollte die Auswirkung von einer kurzfristigen Stressantwort nach 16 h getestet werden. Der Stress wurde nachmittags gesetzt und am nächsten Morgen geerntet.

Bei Betrachtung der Aktivitäten zeigten sich sowohl bei der AO (Abb. 43 A) als auch bei der XDH (Abb. 43 B) keine Abweichungen zur Kontrolle, wie bei 44 und 66 h beobachtet wurde. Bei den AO-RNAi-Pflanzen war nur eine geringe AO-Aktivität nachweisbar.

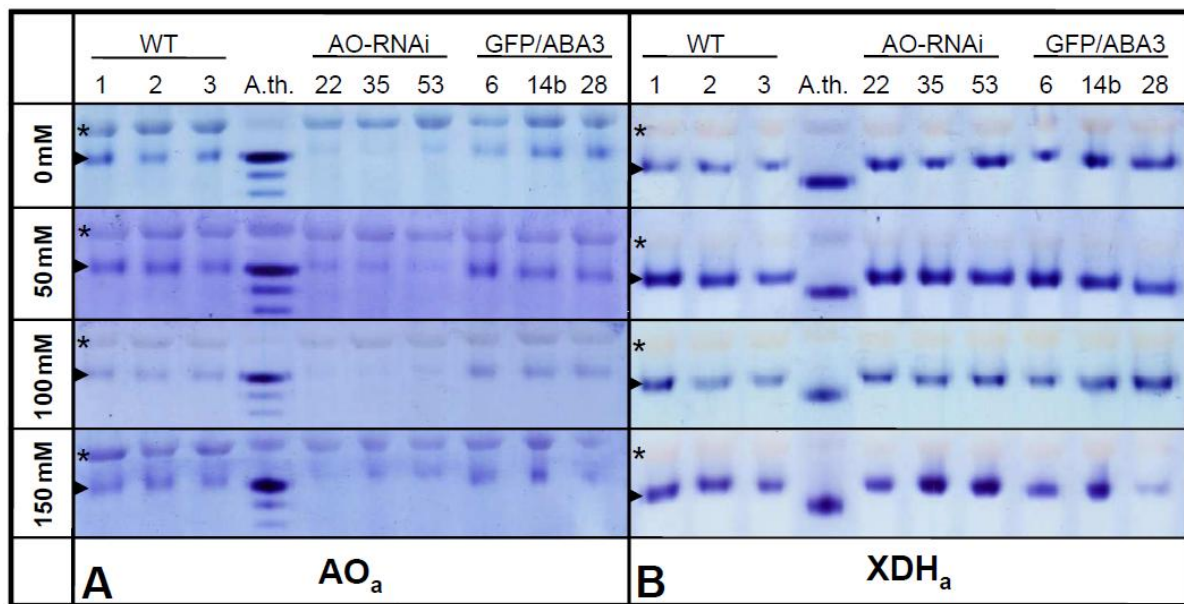


Abb. 43: NaCl-Stress für 16 h. Wildtyp (WT 1, 2, 3), AO-RNAi- (22, 35, 53) und GFP/ABA3-Pflanzen (6, 14b, 28) wurden den Konzentrationen 50 mM, 100 mM und 150 mM ausgesetzt. Als 0 mM Kontrolle wurde ddH₂O zugegeben. Nach PAGE zeigt sich im 7,5%igen Trenngel eine annähernd gleiche AO- (A) und XDH-Aktivität (B). Bei allen Pflanzen sind die unspezifischen Banden (*) zu sehen.

ABA wurde nur von den Konzentrationen 50 und 150 mM NaCl bestimmt. Nach diesem kurzen Stress wurden jedoch deutlich höhere ABA-Werte im Vergleich zu den längeren Stressansätzen gemessen. Hier stiegen die Werte beim Wildtyp um das 14,4 und 16,4 fache an, auch die AO-RNAi-Pflanzen mit einer 6,0 und 11,2 fachen Erhöhung und die Überexprimierer mit einem 8,3 und 15,9 fachen Anstieg zeigten diese starke Veränderung (Abb. 44).

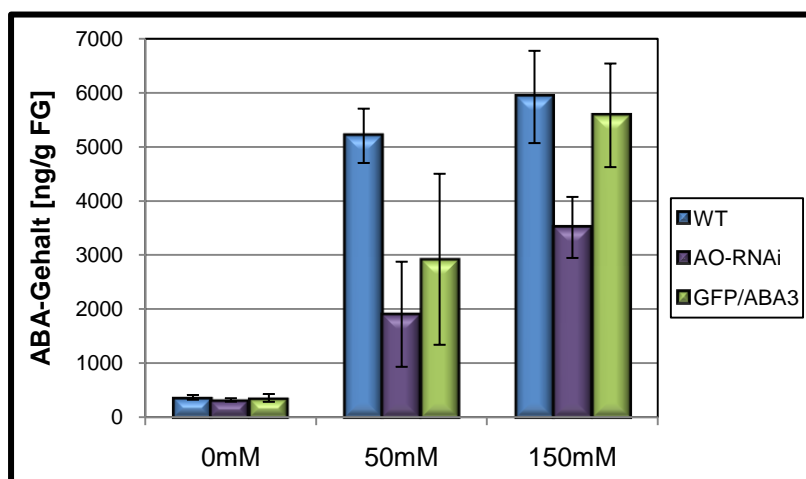


Abb. 44: ABA-Gehalte des NaCl-Stresses für 16 h in ng pro FG. Die zugehörigen Aktivitäten sind in Abb. 43 zu sehen. Die Werte der Wildtypen (WT), AO-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen wurden gemittelt.

Nach Überprüfung und Auswählen bestimmter ABA3-RNAi-Pflanzen für die Salzstressuntersuchungen, wurde dieser Ansatz dann mit allen zur Verfügung stehenden Transformanten wiederholt. Jedoch wurden nur zwei verschiedene NaCl-Konzentrationen getestet: 75 und

150 mM. Nach der 16 stündigen Behandlung mit NaCl wurden die verschiedenen Pflanzen hinsichtlich möglicher Aktivitätsänderungen kontrolliert.

Sowohl die AO- (Abb. 45 A) als auch die XDH-Aktivität (Abb. 45 B) erscheinen bei den Wildtypen und den ABA3-Überexprimierern leicht erhöht unter Zugabe von 75 mM NaCl im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch sinkt diese wieder auf ein niedrigeres Niveau bei 150 mM. Die ABA3 knock down-Pflanzen zeigen bei keiner Konzentration eine spezifische AO- bzw. XDH-Bande, was bedeutet, dass keine Aktivität nachweisbar ist.

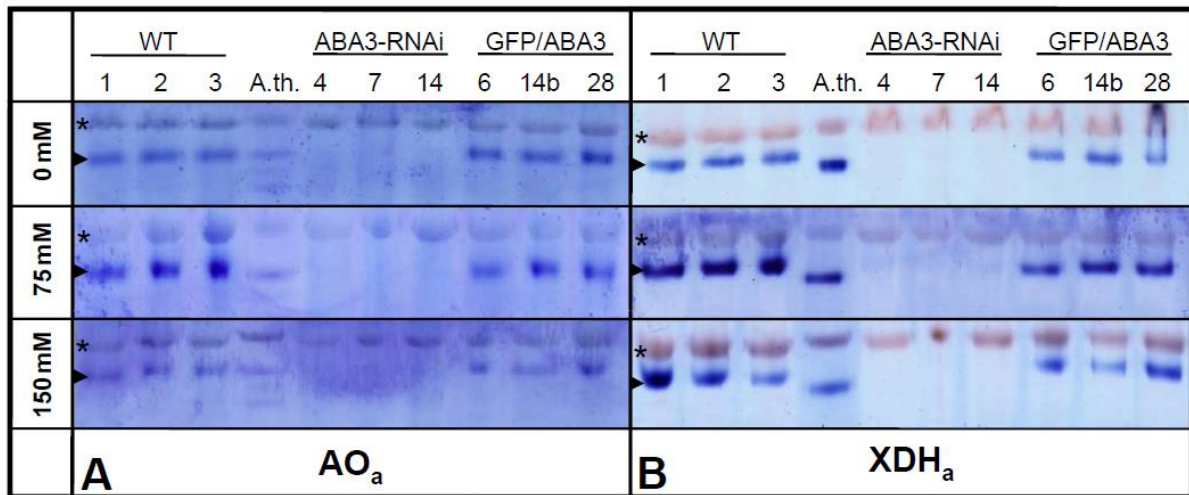


Abb. 45: NaCl-Stress für 16 h. Wildtyp (WT 1, 2, 3)-, ABA3-RNAi (4, 7, 14) und GFP/ABA3-Pflanzen (6, 14b, 28) wurden den Konzentrationen 75 mM und 150 mM ausgesetzt. Als 0 mM Kontrolle wurde ddH₂O zugegeben. Nach PAGE zeigt sich im 7,5%igen Trenngel eine leicht gesteigerte AO- (A) und XDH-Aktivität (B) bei 75 mM und annähernd gleiche Bandengröße bei 0 mM und 150 mM. Bei allen Pflanzen sind die unspezifischen Banden (*) zu sehen.

Obwohl die AO-Aktivität nur eine geringe Erhöhung bei 75 mM und eine gleiche Aktivität bei der Kontrolle und bei 150 mM NaCl aufweist, zeigen sich doch deutliche Anstiege beim ABA-Gehalt (Abb. 46). In der Abbildung sind auch die ABA-Werte der AO-RNAi-Pflanzen zu finden.

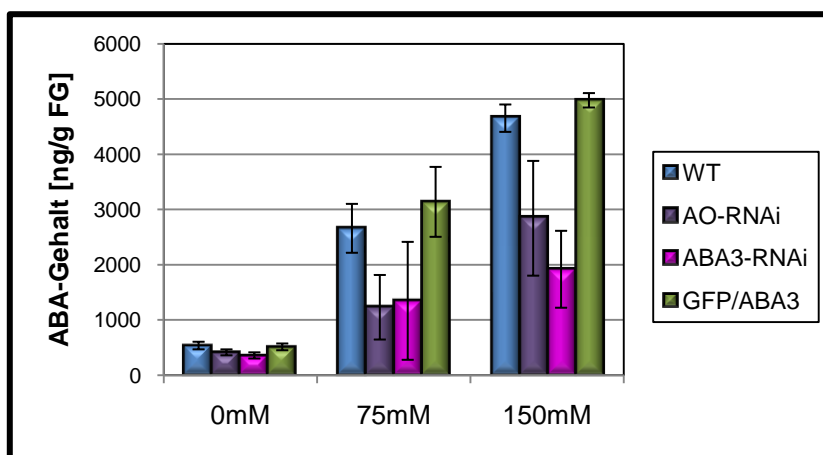


Abb. 46: ABA-Gehalte des NaCl-Stresses für 16 h in ng pro FG. Die zugehörigen Aktivitäten sind in Abb. 45 zu sehen. Die Werte der Wildtypen, AO-RNAi-, ABA3-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen wurden gemittelt.

In Tab. 8 sind die Anstiege der ABA-Gehalte in Folge des NaCl-Stresses als Wert angegeben. Dabei wird deutlich, dass der geringste Anstieg bei der 75 mM NaCl-Applikation eine dreifache Erhöhung bedeutet, die bei den AO-RNAi-Pflanzen zu finden ist. Die Steigerungen sind bei den RNAi-Pflanzen geringer als bei den Wildtypen und den Überexprimierern. Dies zeigt sich auch bei einem stärkeren Stress von 150 mM NaCl. Jedoch sind die Anstiege insgesamt höher als bei der geringeren NaCl-Konzentration.

Tab. 8: Erhöhung des ABA-Gehaltes der Pflanzen aus Abb. 46 im Vergleich zur Kontrolle

	Erhöhung des ABA-Gehalts im Vergleich zur Kontrolle	
	75 mM	150 mM
WT	5,0	8,7
AO-RNAi	3,0	6,9
ABA3-RNAi	3,8	5,4
GFP/ABA3	6,2	9,8

ABA besitzt großen Einfluss auf die Öffnungsweite der Stomata. Ergänzend wurden deshalb Spaltöffnungsabdrücke von Blättern des Wildtypen und der Transformanten angefertigt, die für 16 h 75 mM NaCl ausgesetzt wurden (Unold, 2010). Es wurden Aufnahmen von jeweils drei verschiedenen Pflanzen des Wildtyps, der AO-RNAi-, ABA3-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen gemacht und davon jeweils 25 verschiedene Spaltöffnungen vermessen. Solche Aufnahmen sind beispielhaft in Abb. 48 gezeigt. In der linken Spalte ist die Kontrolle, in der rechten der Salzstress zu sehen. Da die Transformanten untereinander immer ein ähnliches Verhalten aufwiesen, ist hier jeweils nur ein Vertreter aus jeder Gruppe gezeigt. Es ist der Unterschied zwischen der Kontrolle und dem Salzstress (16 h, 75 mM) zu sehen.

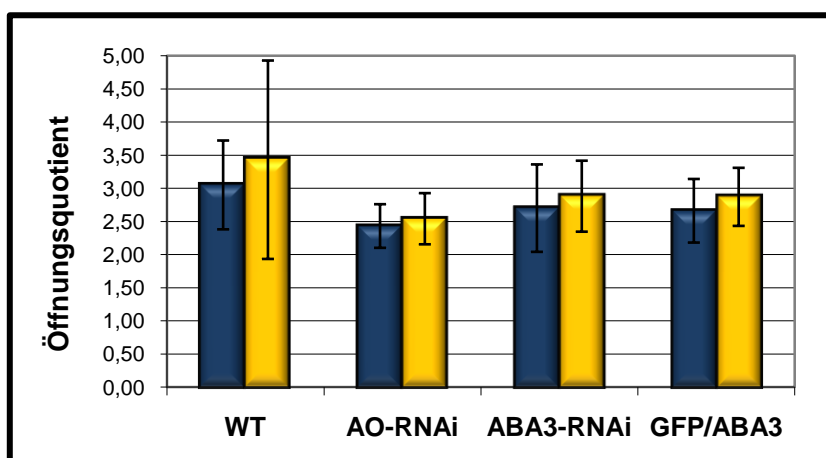


Abb. 47: Öffnungsweite der Stomata im unbehandelten Zustand (dunkelblau) und nach 16 h 75 mM NaCl (gelb). Dargestellt sind Wildtyp (WT), AO-RNAi-, ABA3-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen. Je kleiner der Quotient aus Zellbreite und Spaltöffnungsbreite ist, desto größer ist die Öffnung.

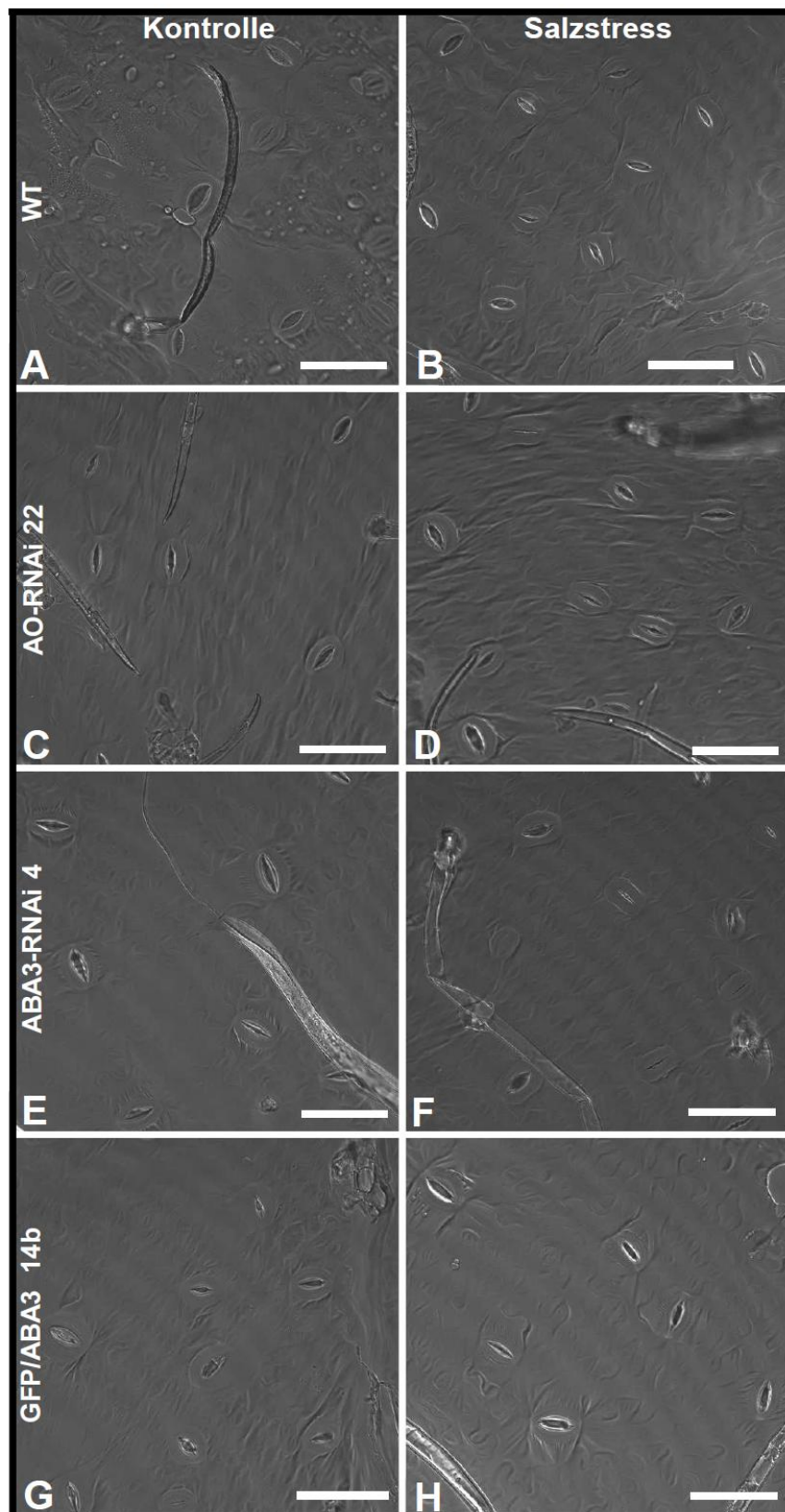


Abb. 48: PMMA-Abdrücke der Kontrolle (linke Spalte) im Vergleich zum Salzstress (rechte Spalte). Gezeigt sind cLSM-Aufnahmen im Durchlichtkanal der erstellten PMMA-Abdrücke der unteren Epidermis von *P. x canescens* Wildtyp (WT) (A, B), der AO-RNAi 22 (C, D), der ABA3-RNAi 4 (E, F) und der ABA3-Überexprimierern Nr. 14b (G, H). Der weiße Balken in den Bildern besitzt eine Größe von 50 µm.

Für eine quantitative Auswertung wurde der Quotient aus der Zellbreite zu der Spaltöffnungsweite berechnet (Abb. 47). Je kleiner dieser Quotient ist, desto größer ist die Öffnung. Die Quotienten liegen dabei alle im selben Bereich, was deutlich an der Standardabweichung zu erkennen ist. Ein Unterschied durch eine Reduzierung der *ao*- bzw. *aba3*-Transkripte bzw. einer Überexprimierung von ABA3 ist nicht feststellbar.

2.6.3 16- und 40-stündige NaCl-Applikation im Vergleich

Im kurzfristigen Stress nach 16 h konnten insgesamt höhere Anstiege der ABA-Gehalte durch NaCl erzielt werden als in der langfristigen Behandlung von 44 bzw. 66 h. Auf Grund dieser unterschiedlichen Beobachtung sollten die beiden Zeiträume direkt miteinander verglichen werden, in dem zum selben Zeitpunkt beide Stresse mit gleichaltrigem Pflanzenmaterial durchgeführt werden.

In Abb. 49 sind vom Wildtyp, den AO-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen jeweils nur zwei Pflanzen zu finden, jedoch drei ABA3-RNAi-Pflanzen. Durch den begrenzten Platz von zehn Proben auf einem Proteingel wurden diese Proben ausgewählt. Da alle drei Linien der transgenen Pflanzentypen sich untereinander gleich bezüglich der AO- und XDH Aktivitäten verhalten, ist dies auch für den vorliegenden Stress zu erwarten. Bei der Ermittlung der ABA-Gehalte wurden aber wieder die Werte aller drei Linien pro Pflanzentypen gemittelt (Abb. 50).

Hinsichtlich der AO-Aktivität (Abb. 49 A) lassen sich keinerlei Unterschiede zwischen den verschiedenen NaCl-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Bei den AO knock downs ist eine schwache AO-Bande zu sehen, jedoch keinerlei Aktivität bei den ABA3-RNAi-Pflanzen.

Die XDH-Aktivität (Abb. 49 B) nimmt durch NaCl-Zugabe leicht zu. Diese Erhöhung ist bei 75 mM NaCl am stärksten. Keine Aktivität ist bei den ABA3-RNAi-Pflanzen zu beobachten.

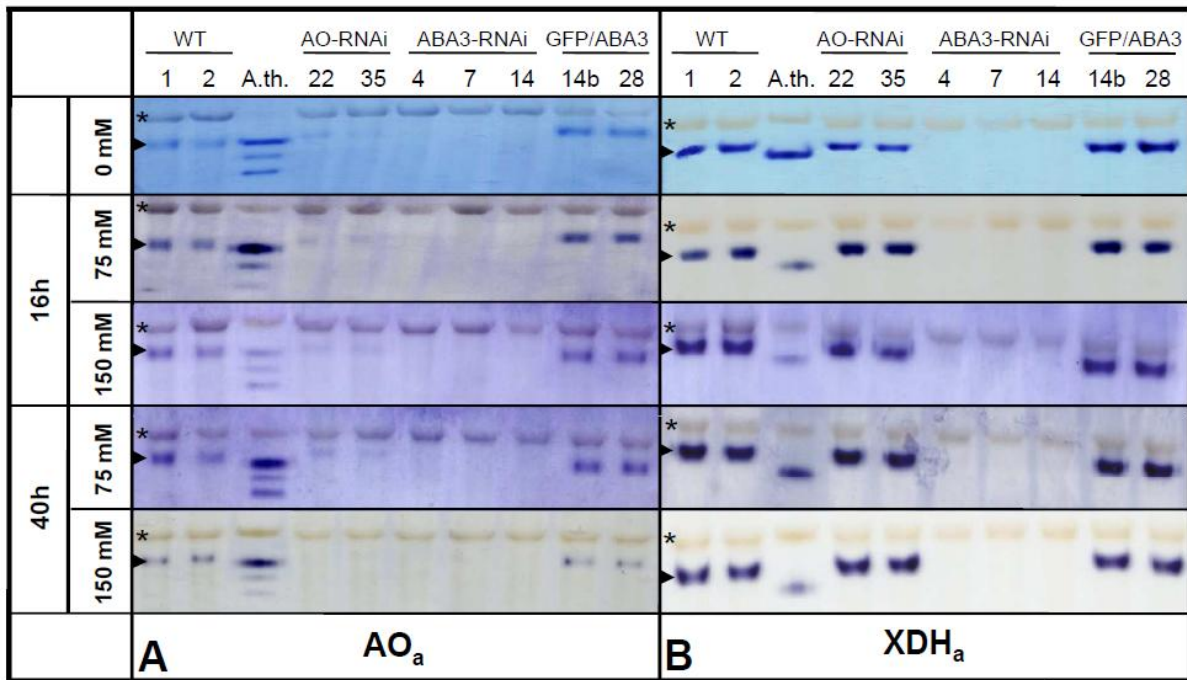


Abb. 49: Kurz- und langfristiger NaCl-Stress im Vergleich. Wildtyp (WT 1, 2), AO-RNAi- (22, 35), ABA3-RNAi- (4, 7, 14) und GFP/ABA3-Pflanzen (14b, 28) wurden den Konzentrationen 75 mM gezeigt. Im 7,5%igen Trenngel zeigt sich eine leicht gesteigerte AO-Aktivität. Die XDH-Aktivität erscheint unverändert. Bei allen Pflanzen sind die unspezifischen Banden (*) zu sehen.

Die ABA-Gehalte zeigen dieselben Tendenzen wie in den vorherigen Stressansätzen. Nach kurzer Zeit kann mehr ABA gemessen werden als weitere 24 h später.

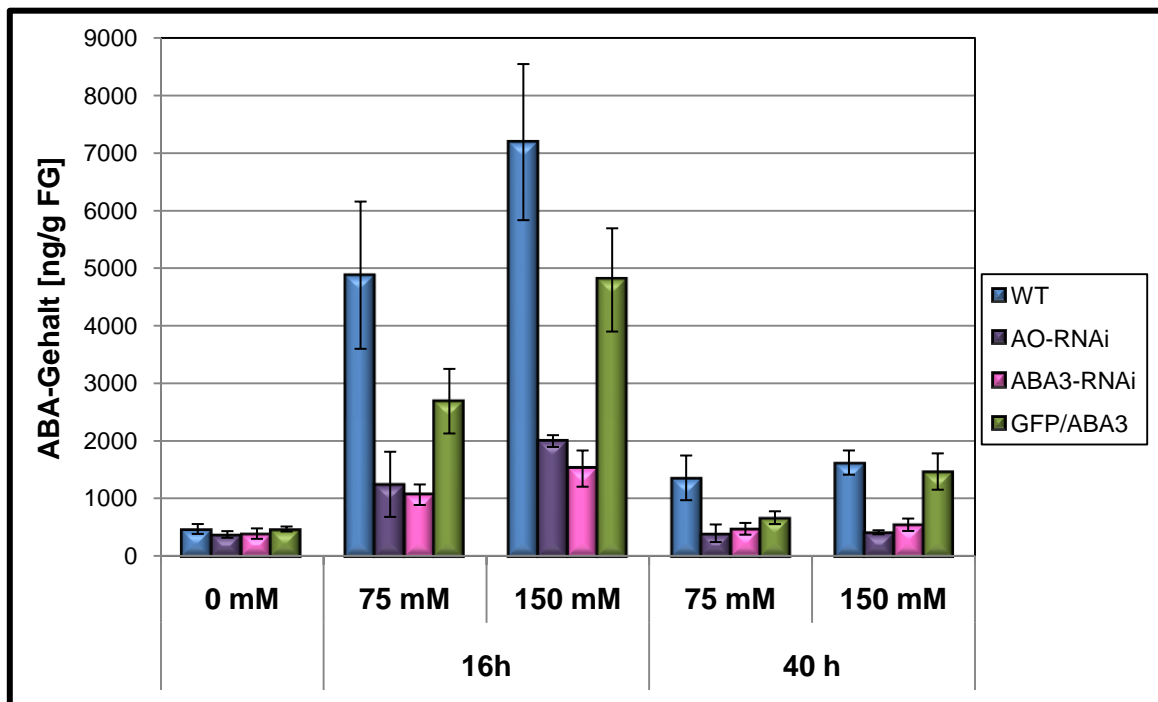


Abb. 50: ABA-Gehalte des kurz- und langfristigen NaCl-Stresses für 16 h und 40 h in ng pro FG. Die zugehörigen Aktivitäten sind in Abb. 49 zu sehen. Die Werte der Wildtypen (WT), AO-RNAi, ABA3-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen wurden gemittelt.

Die höchsten Werte weist der Wildtyp auf. Hier kann eine Erhöhung um das 15,4 fache nach 16 h und 150 mM gemessen werden. Diese Dauer und Konzentration führt bei allen Pflanzentypen zu den höchsten ABA-Gehalten. Alle Werte der transgenen *P. x canescens* liegen bei allen NaCl-Behandlungen unterhalb des Wildtyps. Die geringsten Gehalte zeigen aber die knock down-Pflanzen, deren Werte ungefähr im gleichen Bereich liegen. Bei 75 mM NaCl steigen die ABA-Konzentrationen nach 16 h um das dreifache, bei 150 mM um das 4,6 fache im Mittel. Nach weiteren 24 h ist aber nur noch eine ungefähre Verdopplung messbar. Beim Wildtyp und bei den ABA3-Überexprimierern sind Werte bis zu einer Verdreifachung messbar (Tab. 9). Dieser Unterschied zwischen den verschiedenen Pflanzentypen ist im unbehandelten Zustand nicht zu finden.

Tab. 9: Erhöhung des ABA-Gehaltes der Pflanzen aus Abb. 50 im Vergleich zur Kontrolle

	Erhöhung des ABA-Gehalts im Vergleich zur Kontrolle			
	16 h		40 h	
	75 mM	150 mM	75 mM	150 mM
WT	10,4	15,4	2,9	3,5
AO-RNAi	3,3	5,4	1,1	1,1
ABA3-RNAi	2,7	3,9	1,2	1,4
GFP/ABA3	5,8	10,3	1,4	3,1

Zusammenfassend lässt sich also beobachten, dass ein Salzstress keine Veränderung der AO-Aktivität bewirkt, jedoch eine geringe Erhöhung der XDH-Aktivität. Die ABA-Gehalte zeigen eine deutliche Dynamik unter Salzstress: 16 h Stressapplikation bewirkt einen starken Anstieg und nach längerer Inkubationszeit sinken die Werte wieder auf ein geringeres Niveau. Dies ist beim Wildtyp, bei den AO und ABA3 knock down- und den ABA3-Überexprimierern der Fall, jedoch zeigen die knock down-Pflanzen geringere Erhöhungen.

2.6.4 NaCl-Induktion des ABA3-Promoters

Zusätzlich zu den AO- und XDH-Aktivitäten sollte auch die Induktion des ABA3-Promoters auf NaCl getestet werden. Die in Abschnitt 2.3.6 beschriebenen ABA3::GUS-Pflanzen 8, 27 und 50 wurden dafür verwendet. Acht Wochen alte *in-vitro* Pflanzen wurden mit 50, 100 und 150 mM NaCl über verschiedene Zeiträume gestresst. Es sollte die GUS-Expression nach 1, 5, 24 und 120 h gemessen werden.

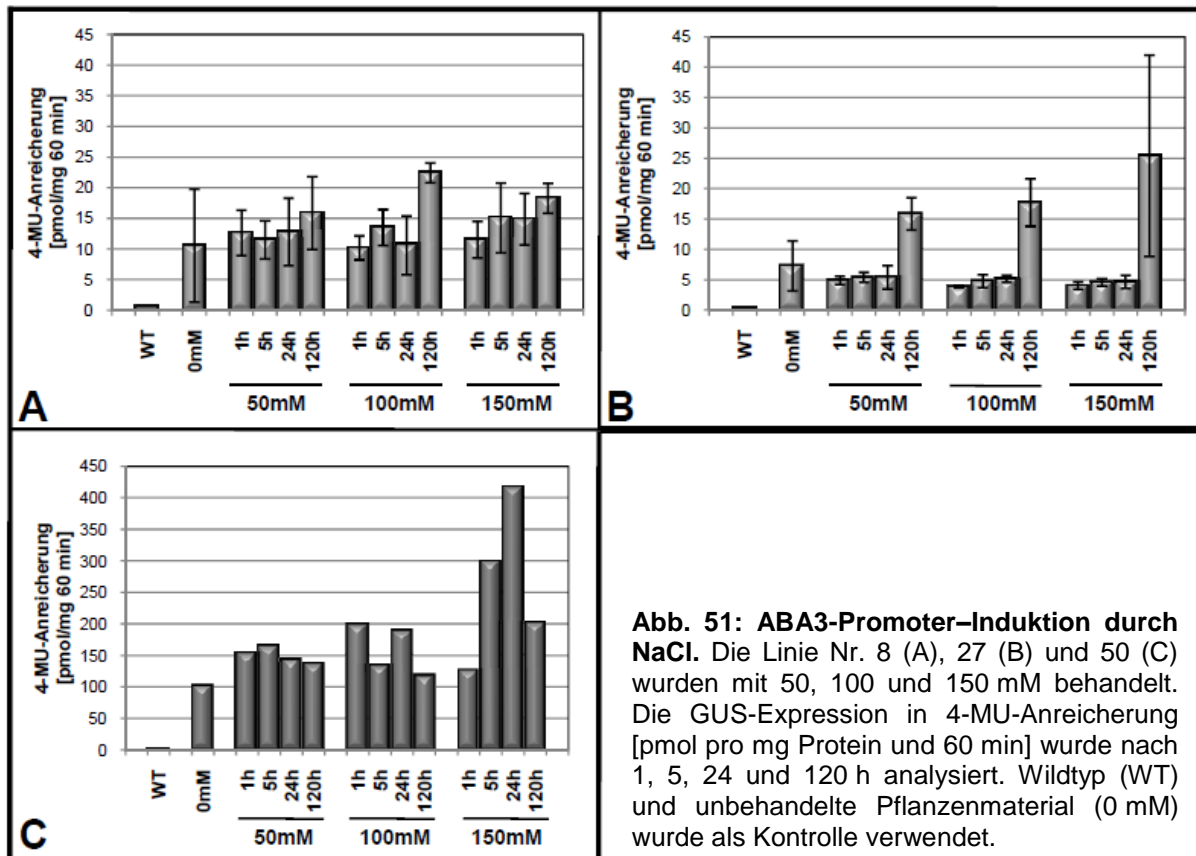


Abb. 51: ABA3-Promoter-Induktion durch NaCl. Die Linie Nr. 8 (A), 27 (B) und 50 (C) wurden mit 50, 100 und 150 mM behandelt. Die GUS-Expression in 4-MU-Anreicherung [pmol pro mg Protein und 60 min] wurde nach 1, 5, 24 und 120 h analysiert. Wildtyp (WT) und unbehandeltes Pflanzenmaterial (0 mM) wurde als Kontrolle verwendet.

Die Expression ist in Abb. 51 in 4-MU-Anreicherung in pmol pro mg Protein und 60 min dargestellt. Die Pflanzen Nr. 8 und 27 (Abb. 51 A und B) zeigen dieselbe Tendenz. Es scheint erst nach längerer Dauer von fünf Tagen (120 h) eine Induktion des ABA3-Promoters zu geben. Innerhalb der ersten 24 h gibt es nur leichte Schwankungen, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 mM) keine signifikante Erhöhung zeigen. Am stärksten ist die Induktion bei Nr. 27 (Abb. 51 B). Diese Induktion zeigte sich bei Nr. 50 nicht, denn in Abb. 51 C ist keine klare Steigung der Expression nach 120 h zu sehen, sondern nur Schwankungen bei den unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen und Stressdauern im Vergleich zur Kontrolle.

Zusammenfassend lässt sich nur eine Tendenz der Induktion nach 120 h feststellen. Für ein eindeutiges Ergebnis hätte diese bei allen drei Linien zu finden sein müssen.

2.7 Effekte von Trockenstress auf die transgenen Pappeln

Da ABA in osmotischen Stresssituationen beteiligt ist, sollten auch die Auswirkungen von Trockenstress auf die AO und XDH untersucht werden. Dafür wurden abgetrennte Blätter des Wildtyps und der in 3.3 beschriebenen transgenen Pappeln langsam getrocknet. Die

Veränderungen durch den Stress sind daher alleinig auf Reaktionen innerhalb der Blätter zurückzuführen.

In Abb. 52 sind die Wasserverluste über die Zeit von verschiedenen Ansätzen der Wildtypen, AO-RNAi-, ABA3-RNAi und GFP/ABA3-Pflanzen dargestellt. In (A) bis (C) fehlen die ABA3-RNAi-Pflanzen, da sie erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung standen. Der Wasserverlust der verschiedenen Pflanzentypen verläuft nicht immer gleichmäßig. In (A) und (F) weisen die ABA3-Überexprimierer den geringsten Verlust des Frischgewichtes auf, jedoch in (B) bis (D) verlaufen die Trocknungen aller Pflanzen gleichförmig. Die knock down-Pflanzen hingegen verlieren in (E) das Wasser am langsamsten. Anhand der verschiedenen Wasserverlustgraphiken (Abb. 52) ist zu erkennen, dass sich hier kein einheitliches Bild zeigt. So kann insgesamt von einer gleichmäßigen Austrocknung der Wildtypen, knock down-Pflanzen und der ABA3-Überexprimierer ausgegangen werden. Diesbezüglich ist kein unterschiedlicher Phänotyp zu erkennen. Dieses Phänomen scheint deshalb eher in der Beschaffenheit der einzelnen Blätter als in der genetischen Modulation begründet zu sein.

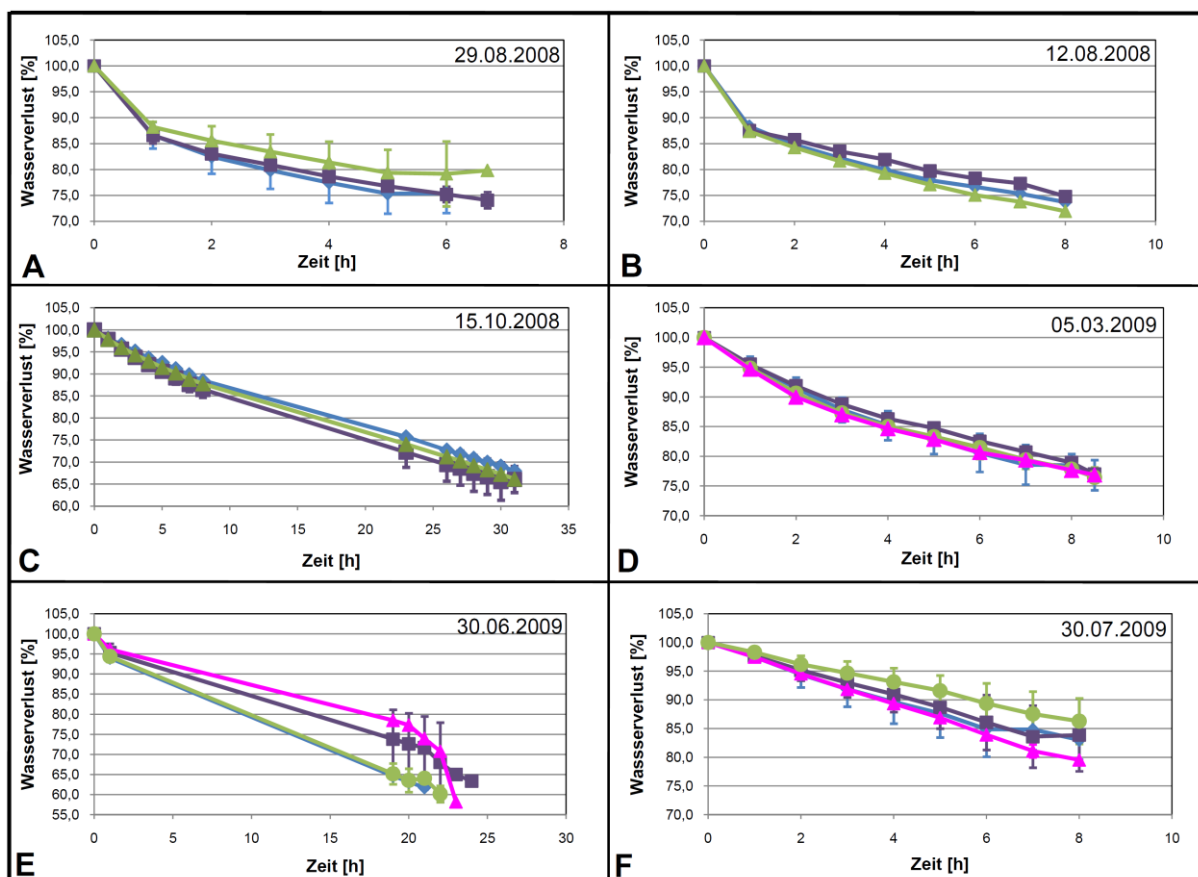


Abb. 52: Wasserverlust über die Zeit von verschiedenen Versuchsansätzen. Es zeigt sich insgesamt eine gleichmäßige Austrocknung aller Pflanzentypen. In (A) bis (C) standen die ABA3-RNAi-Pflanzen noch nicht zur Verfügung. Die Verluste der Wildtypen (---◆---), der AO-RNAi- (---■---), ABA3-RNAi- (---▲---) und GFP/ABA3-Pflanzen (---●---) sind gemittelt.

Für die AO-RNAi- und die Wildtyp-Pflanzen wurde eine RT-PCR durchgeführt, die die Transkriptveränderungen der PtAO2 in Folge des Trockenstresses zeigt (Hamisch, 2009). In der Kontrolle zeigen die Wildtypen eine deutlich stärkere Bande als die AO knock down-Pflanzen bei gleicher cDNA-Konzentration. Im unbehandelten Zustand ist also eine Verringerung der mRNA zu vermuten, jedoch sind für eindeutige Ergebnisse entweder eine semiquantitative PCR mit internem Standard oder eine real time PCR nötig. Im Trockenstress sind die Banden drastisch reduziert. Im Wildtyp ist eine schwache Bande zu erkennen und in den AO-RNAi-Pflanzen ist keine Bande nachweisbar (Abb. 53).

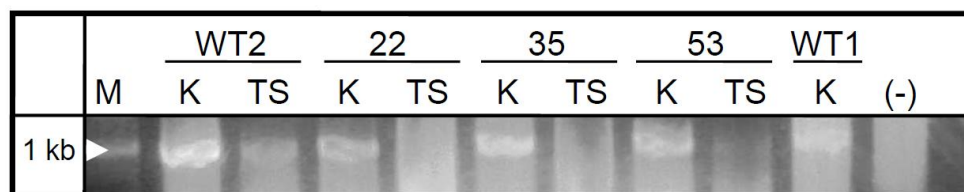


Abb. 53: RT-PCR der AO-RNAi-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (WT). Gezeigt sind unbehandelte Proben (K) und Proben unter Reduktion von 40% des Frischgewichtes (TS).

Auf Grund des Einflusses, den ABA auf die Öffnungsweite der Stomata hat, wurden PMMA-Abdrücke von unbehandelten und getrockneten Pflanzen (1 und 4 h) angefertigt. Es wurden Aufnahmen von jeweils drei verschiedenen Pflanzen des Wildtyps, der AO-RNAi-, ABA3-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen gemacht und davon jeweils 25 verschiedene Spaltöffnungen vermessen. Solche Aufnahmen sind beispielhaft in Abb. 55 für je einen Vertreter aus den Pflanzentypen (Wildtyp, AO-RNAi, ABA3-RNAi und GFP/ABA3) gezeigt. Es wurde der Quotient aus der Zellbreite zu der Spaltöffnungsbreite berechnet (Abb. 54). Je kleiner dieser Quotient ist, desto größer ist die Öffnung.

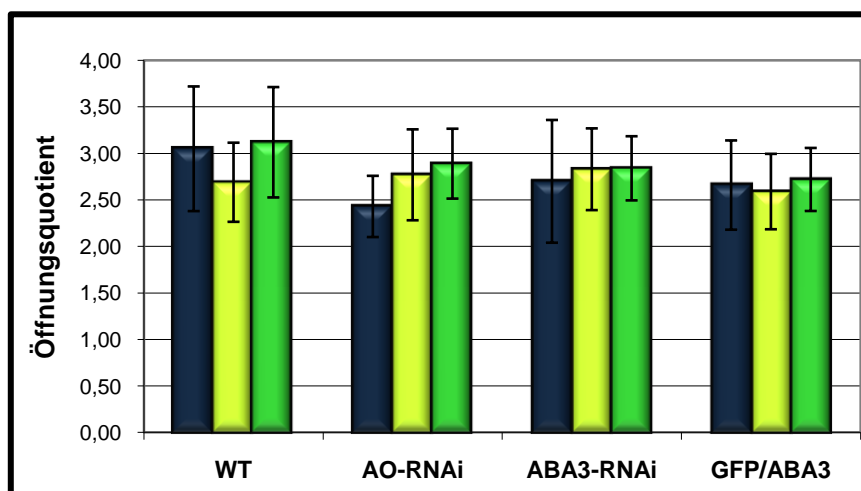


Abb. 54: Öffnungsweite der Stomata im unbehandelten Zustand (dunkelblau), sowie nach 1 h (gelb) und 4 h Trockenstress (grün). Dargestellt sind Wildtyp (WT), AO-RNAi-, ABA3-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen. Je kleiner der Quotient aus Zellbreite und Spaltöffnungsbreite ist, desto größer ist die Öffnung.

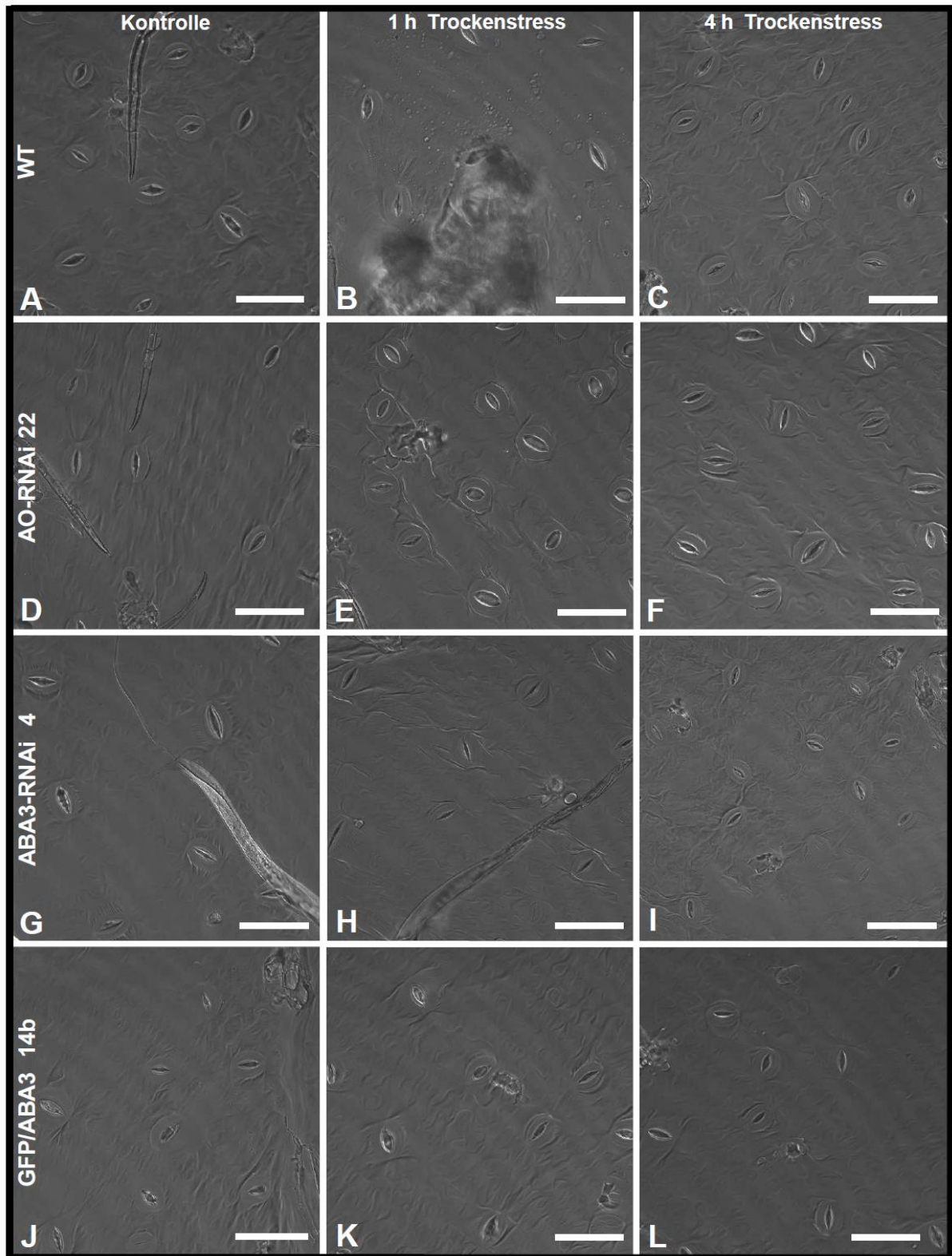


Abb. 55: PMMA-Abdrücke der Kontrolle (linke Spalte) im Vergleich zum Trockenstress für 1 h (mittlere Spalte) und für 4 h (rechte Spalte). Gezeigt sind cLSM-Aufnahmen im Durchlichtkanal der erstellten PMMA-Abdrücke der unteren Epidermis von *P. x canescens* WT (A, B, C), der AO-RNAi 22 (D, E, F), der ABA3-RNAi 4 (G, H, I) und der ABA3-Überexprimierern Nr. 14b (J, K, L). Der weiße Balken in den Bildern besitzt eine Größe von 50 µm.

Die Öffnungsquotienten liegen alle im selben Bereich. Es lassen sich keine signifikanten Veränderungen durch den Trockenstress feststellen. Eine phänotypische Veränderung der Öffnungsweite ist auch durch die Reduzierung der *ao*- und *aba3*-Transkripte oder die ABA3-Überexpression nicht zu beobachten.

2.7.1 Effekte von Trockenstress auf die AO- und XDH-Aktivität

Im ersten Ansatz ohne ABA3-RNAi-Pflanzen wurden die Wildtypen, die AO-RNAi-Pflanzen und die ABA3-Überexprimierer bis zu einem Verlust von 25 und 35% des Frischgewichts getrocknet.

In Abb. 56 sind in den beiden oberen Reihen die Kontroll- und die Trockenstressfärbung des 25%igen Verlust des Frischgewichts zu finden und darunter die des 35%igen. Die AO-Aktivität (Abb. 56 A) der getrockneten Proben erscheint leicht gesteigert im Vergleich zu den Kontrollen. Die Gele sind alle miteinander vergleichbar, da Arabidopsis auf allen gleich stark gefärbt ist. Besonders durch Trockenstress kommt es zur Intensivierung der unspezifischen Dehydrogenase (in Abb. 56 mit (*) markiert). Diese stärkere Färbung bedeutet demnach keine höhere Proteinkonzentration auf dem Gel. Die AO-Aktivitätssteigerung in Folge des Trockenstress gilt nur für die Wildtypen und die Überexprimierer, denn die spezifischen Banden der AO knock down-Pflanzen weisen keine Veränderungen auf.

Eindeutiger sind die stressbedingten Aktivitätsänderungen der XDH. Hier steigt die Aktivität unter Wasserverlust an. Jedoch sind bei 35% Frischgewichtsverlust die Aktivitäten von zwei Wildtypen und AO-RNAi 53 stark reduziert, was auf einen starken Stress zurückgeführt werden kann.

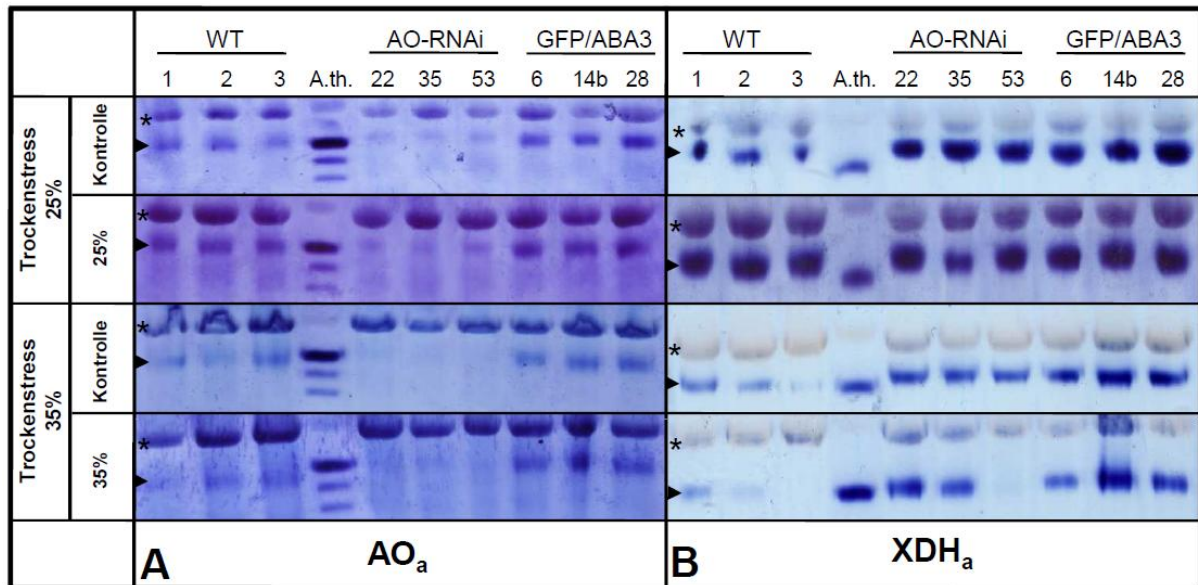


Abb. 56: Verlust des Frischgewichts von 25 und 35% durch Trocknung. In (A) sind die AO-Aktivitäten der Wildtypen (WT 1, 2, 3), der AO knock downs (22, 35, 53) und ABA3-Überexprimierer (6, 14b, 28) und in (B) die entsprechenden XDH-Aktivitäten zu finden. Die beiden oberen Gele sind die Aktivitäten der Kontrollen und in den unteren die der getrockneten Proben zu finden. Bei allen Pflanzen sind die unspezifischen Banden (*) zu sehen.

Der ABA-Gehalt wurde nur von dem 25%igen Verlust bestimmt. Dabei zeigt der Wildtyp im unbehandeltem Zustand (Abb. 57 A) mit 2300 ng ABA/g FG einen doppelt so hohen ABA-Gehalt im Vergleich zu den transgenen Pappeln. Im Trockenstress (Abb. 57 B) kommt es zu einem drastischen Anstieg bei allen Pflanzen. Der Wildtyp-Gehalt erhöht sich um das 23,3 fache, noch stärker ist die Steigung bei den AO-RNAi-Pflanzen (68,3x) und den ABA3 Überexprimierern (62,8x). Sowohl eine down-Regulierung der AO als auch die Überexpression von ABA3 zeigt keinen Unterschied zum Wildtyp-Verhalten.

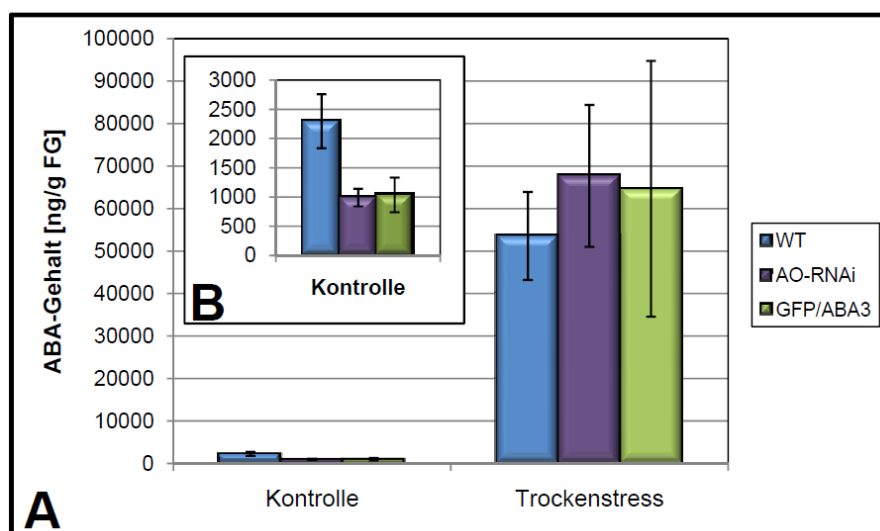


Abb. 57: ABA-Gehalt des 25% Frischgewichtsverlust durch Trocknung in ng pro FG. Die zugehörigen Aktivitäten sind in Abb. 56 zu sehen. In (A) sind die Kontrollen und die getrockneten Proben in einem Diagramm zu finden. (B) zeigt die Kontrollen allein. Die Werte der Wildtypen, AO-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen wurden gemittelt.

Dieser Ansatz wurde zusätzlich zu den vorher getesteten Pflanzen auch mit den ABA3-RNAi-Pflanzen wiederholt. Diesmal wurde jedoch bis 20 und 40% Verlust des Frischgewichtes getrocknet. Die Trocknungsstärken wurden leicht variiert, um mögliche Auswirkungen eines stärkeren bzw. leichteren Stresses festzustellen.

In Abb. 58 A wird deutlich, dass die AO-Aktivität sich durch den Wasserverlust nicht verändert. Es sind keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle bei 20 und 40% beobachtbar. Sowohl die AO-als auch die ABA3-RNAi-Pflanzen zeigen keine AO-Aktivität.

Die Intensität der XDH-Banden (Abb. 58 B) ist zwar in den getrockneten Proben geringer als in der Kontrolle, jedoch ist auch hier die XDH aus Arabidopsis weniger gefärbt. In Anbetracht dieses internen Vergleichs ist keine Veränderung der Aktivität der XDH zu verzeichnen. Bei einem Verlust von 40% sind WT 2 und AO-RNAi 22 etwas stärker im Vergleich zu den anderen gefärbt, jedoch scheint dies nicht signifikant zu sein.

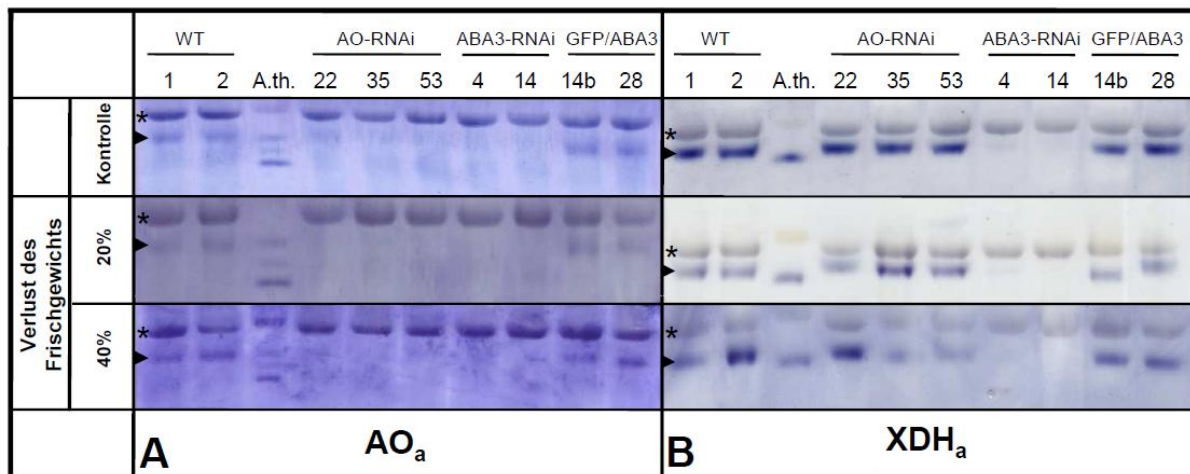


Abb. 58: Verlust des Frischgewichtes von 20 und 40% durch Trocknung. In (A) sind die AO-Aktivitäten der Wildtypen (Nr. 1, 2), der AO knock downs (22, 35, 53), ABA3 knock downs (4, 14) und ABA3-Überexprimierer (14b, 28) und in (B) die entsprechenden XDH-Aktivitäten zu finden. In der oberen Reihe sind die Kontrollgele zu sehen und die beiden unteren Gele stellen die Aktivitäten der getrockneten Proben dar. Bei allen Pflanzen sind die unspezifischen Banden (*) zu sehen.

Der ABA-Gehalt wurde auch von diesem Stressansatz bestimmt (Abb. 59). Die Werte der Kontrollen liegen dabei alle im selben Bereich von 450 ng/g FG. Trotz der nicht nachweisbaren Erhöhung der AO-Aktivität kommt es durch die Trocknung zu einem Anstieg von ABA.

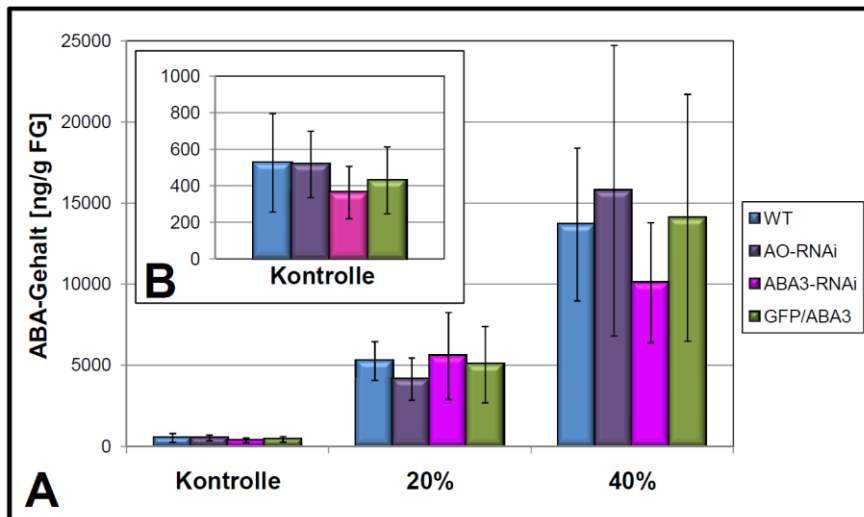


Abb. 59: ABA-Gehalte des 20 und 40% Frischgewichtsverlust durch Trocknung [ng pro FG]. Die zugehörigen Aktivitäten sind in Abb. 58 zu sehen. In (A) sind die Kontrollen und die getrockneten Proben in einem Diagramm zu finden. (B) zeigt die Kontrollen allein. Die Werte der Wildtypen, AO-RNAi-, ABA3-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen wurden gemittelt.

Unter 20% Frischgewichtsverlust ist dieser Anstieg bei den ABA3 knock downs mit einer 15,3 fachen Steigung am größten und am geringsten ist diese bei den AO knock downs mit 8,0. Insgesamt liegen die Gehalte im selben Bereich von ungefähr 5000 ng/g FG. Unter einem stärkeren Trockenstress von 40% Verlust ist auch ein stärkerer Anstieg von ABA zu verzeichnen. Zwar sind hier die Werte der ABA3-RNAi-Pflanzen am geringsten, jedoch sind die Standardabweichungen sehr hoch, so dass die Werte aller Pflanzen mit ungefähr 13400 ng/g FG vergleichbar sind. Es kommt zu Steigungen vom 26 bis 32,7 fachen durch den Verlust von 40% des Frischgewichtes (Tab. 10).

Tab. 10: Erhöhung des ABA-Gehaltes der Pflanzen aus Abb. 59 im Vergleich zur Kontrolle

	Erhöhung des ABA-Gehalts im Vergleich zur Kontrolle	
	20%	40%
WT	10,0	26,0
AO-RNAi	8,0	30,4
ABA3-RNAi	15,3	27,7
GFP/ABA3	11,7	32,7

Zusammenfassend ist durch Trockenstress keine Veränderung der Enzymaktivität der AO zu festzustellen, jedoch ist teilweise ein leichter Aktivitätsanstieg der XDH zu sehen. Diese Beobachtung ist unter allen untersuchten transgenen Pappeln identisch. Jedoch erhöht sich der ABA-Gehalt durch Trocknung drastisch, obwohl kein Unterschied der Aktivitäten festzustellen ist.

2.7.2 Trockenstress-Induktion des ABA3-Promoters

Ergänzend zu den AO- und XDH-Aktivitäten sollte auch die Induktion des ABA3-Promoters durch Trockenstress untersucht werden.

Bei einem Verlust des Frischgewichts von ungefähr 40% wurde die GUS-Expression in 4-MU-Bildung [pmol/mg 60 min] mit dem fluorimetrischen GUS-Assay in den Blättern der ABA3::GUS-Pflanzen 8, 27, 50 und eines Wildtyps bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Blätter derselben Pflanze. In Abb. 60 zeigt Nr. 8 keinerlei signifikante GUS-Expression, da die Werte im Bereich des Wildtypen liegen. Bei Nr. 27 und 50 war in Folge des Trockenstresses eine schwache Repression durch Trockenstress zu beobachten, jedoch könnte es sich hier auch nur um eine Schwankung handeln.

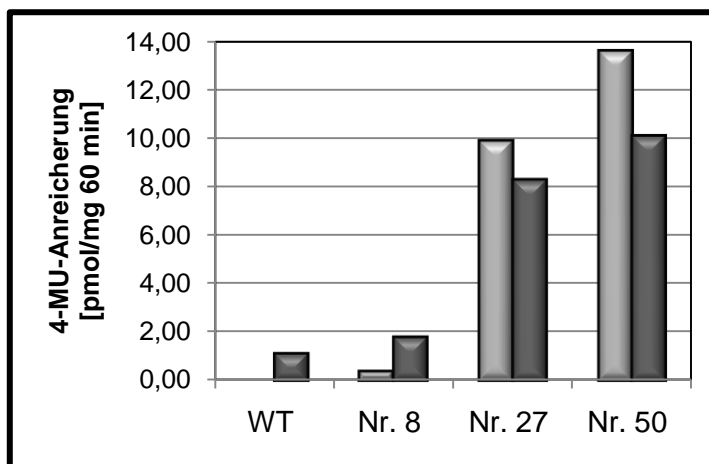


Abb. 60: GUS-Aktivität [4-MU in pmol/mg 60 min] in ganzen Blättern der Pflanzen ABA3::GUS Nr. 8, 27, 50 und eines Wildtyps (WT). Für den Trockenstress (Verlust des Frischgewichtes von etwa 40% bei Nr. 8 und 27 und etwa 60% bei WT und Nr. 50) wurde jeweils ein ganzes Blatt verwendet. Zur Kontrolle ist von jeder Pflanze auch ein unbehandeltes Blatt analysiert worden. Die hellgraue Säule stellt die Kontrolle und die dunkelgraue den Trockenstress dar.

Möglicherweise unterscheidet sich die Induktion des ABA3-Promoters von Blatt zu Blatt. In Folge dessen sind geringe Änderungen der GUS-Aktivität bei Verwendung von verschiedenen, gleichaltrigen Blättern nicht sichtbar. Aus diesem Grund sollten das Kontroll- und das Trockenstress-Material von demselben Blatt stammen. Dafür wurde das jeweilige Blatt beidseits der Mittelrippe geteilt. Eine Blatthälfte wurde getrocknet, die andere in einer mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Petrischale für die Dauer des Trockenstresses gelagert. Auf diese Weise fand die Wundreaktion in beiden Blatthälften gleichermaßen statt, so dass diese keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis der Trockenstress-Induktion hatte. Obwohl in Abb. 60 die Nr. 27 hohe GUS-Werte zeigte, wies diese Linie in anderen Versuchen immer die schwächste Expression auf. Aus diesem Grund sind in Abb. 61 nur Nr. 8 und 50 dargestellt.

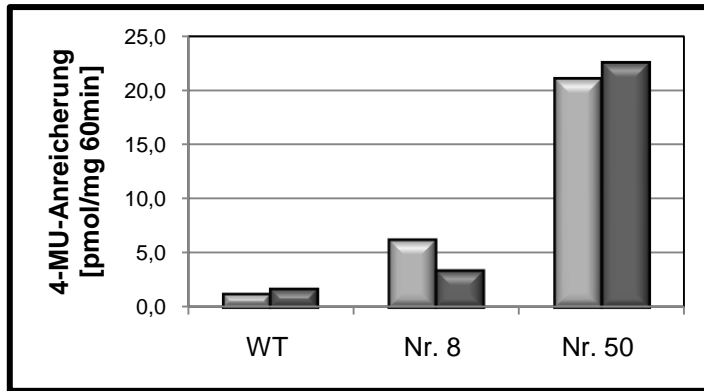


Abb. 61: GUS-Aktivität [4-MU in pmol/mg 60 min] in den Blatthälften der Pflanzen ABA3::GUS Nr. 8, Nr. 50 und eines Wildtyps (WT). Für den Trockenstress (Verlust von etwa 30% des Frischgewichtes) wurde die Mittelachse entfernt und jeweils nur eine Blatthälfte verwendet. Die andere Blatthälfte diente zur Kontrolle. Die hellgraue Säule stellt die Kontrolle und die dunkelgraue den Trockenstress dar.

Auch bei diesem Versuchsansatz zeigen sich keinerlei signifikante Induktion bzw. Repression des ABA3-Promoters durch Trockenstress.

Bei Analysen hinsichtlich der organspezifischen Expression von *aba3* zeigten sich Hinweise auf eine erhöhte ABA3-Promoter-Aktivität in der Nervatur. Aus diesem Grund wurde nach einem Trockenstress ausschließlich die Nervatur der Blattbasis geerntet und dort die GUS-Aktivität bestimmt (Abb. 62).

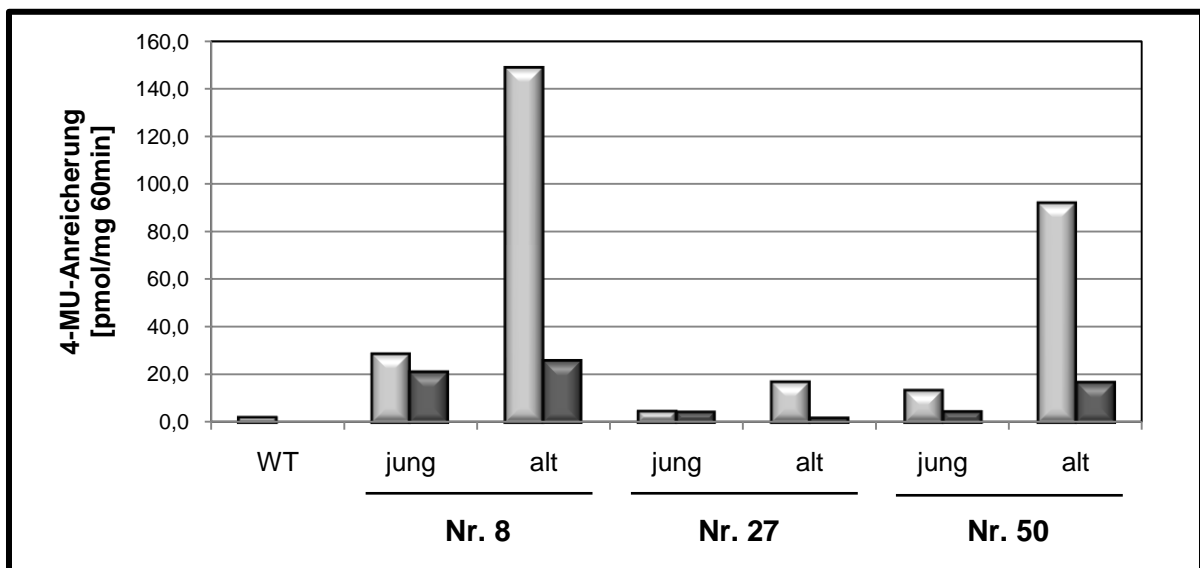


Abb. 62: GUS-Aktivität [4-MU in pmol/mg 60 min] in der Nervatur der Blattbasis der Pflanzen ABA3::GUS Nr. 8, 27, 50 und eines Wildtyps (WT). Für den Trockenstress (Verlust von etwa 30% des Frischgewichtes) und die Kontrolle wurde jeweils nur die Nervatur der Blattbasis von jungen und alten Blättern verwendet. Die hellgraue Säule stellt die Kontrolle und die dunkelgraue den Trockenstress dar.

In der Nervatur waren deutlich höhere GUS-Aktivitäten zu beobachten. Dies gilt vor allem für ABA3::GUS Nr. 8 und 50. Bei Nr. 27 war hingegen nur eine geringe Aktivität zu messen. Bedingt durch Trockenstress verringert sich bei allen Pflanzen die GUS-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

2.8 Organspezifische Expression von ABA3

Mit Hilfe des ABA3::GUS-Promoter-Konstruktes wurde untersucht, inwiefern ABA3 organspezifisch exprimiert wird. Diese Analyse fand mit Hilfe der histochemischen GUS-Färbung der ABA3::GUS-Pflanzen statt.

Es zeigte sich die stärkste Färbungsintensität in ABA3::GUS Nr. 8. Bei der Färbung des gesamten Blattes war eine Blaufärbung der Blattnervatur der Blattbasis (Abb. 63 A) zu beobachten. In der Spitze (Abb. 63 C) war kein Farbumschlag zu erkennen, genauso wenig wie im Wildtyp (Abb. 63 B). Als Positiv-Kontrolle wurde die Transformante BG33 verwendet. In diese Pflanze wurde ein Fragment eingebracht, das aus einem blattspezifischen Promoter und dem dahinter liegendem *gusA*-Gen besteht. Hier ist eine Blaufärbung über das ganze Blatt hinweg zu sehen.

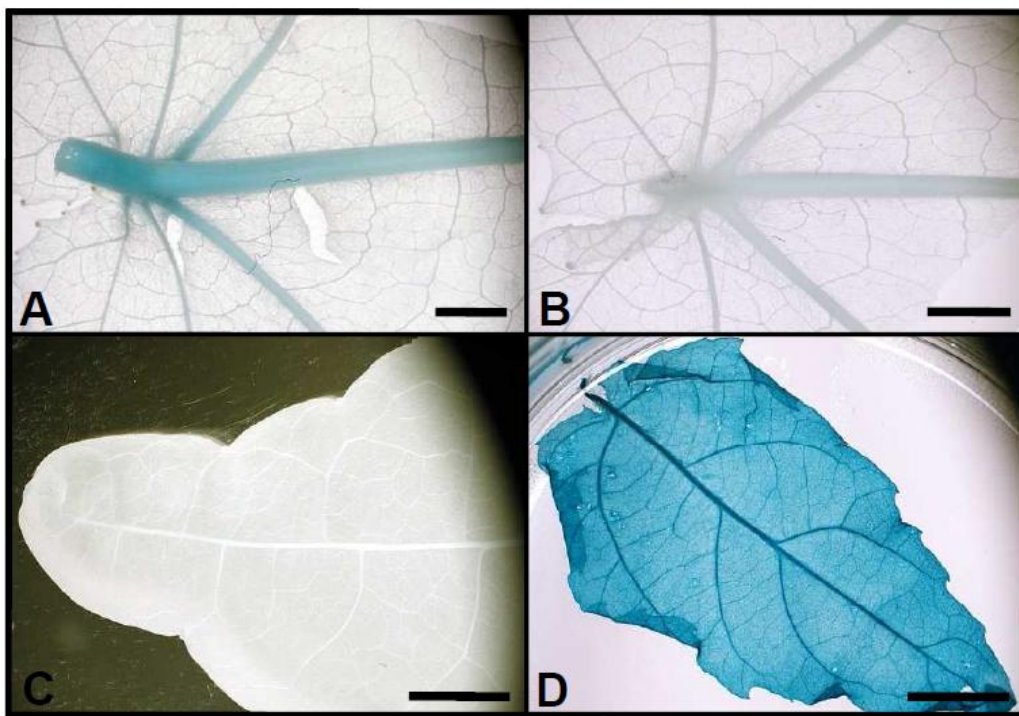


Abb. 63: Histochemische GUS-Färbung bei Blattmaterial von ABA3::GUS Nr. 8 und einer Wildtyp-Pflanze (WT). (A) Eine Blaufärbung war nur in der Nervatur älterer Blätter der ABA3::GUS-Pflanzen in der Blattbasis zu sehen (hier dargestellt an einem älteren Blatt von ABA3-GUS Nr. 8). (B) Beim Blatt des Wildtyps zeigte sich keinerlei Färbung. (C) Auch in der Blattspitze von ABA3::GUS Nr. 8 war keine Färbung zu beobachten. (D) Die Pappeltransformante BG33 exprimiert GUS und dient hier als Positivkontrolle. Die schwarzen Balken stellen den Maßstab dar. In (A) und (B) beträgt dieser 2 mm und in (C) und (D) 5 mm.

Bei Wiederholung der Analyse der organspezifischen Expression von ABA3 kam es zu einer Hintergrundfärbung des Wildtyps. Diese konnte trotz mehrfacher Variation der Versuchsbedingungen und Nutzung unterschiedlicher Wildtyppflanzen nicht eliminiert werden (Berthold, 2009). Auf Grund dessen können die hier gezeigten Färbungen nur als Indiz für eine gesteigerte Expression in der Nervatur der Blattbasis dienen.

Falls aber eine gesteigerte Expression in der Nervatur zu finden ist, wären Auswirkungen auf die Aktivität der AO und XDH zu erwarten. Deshalb wurden Aktivitätsfärbungen der Nervatur im Vergleich zum ganzen Blatt des Wildtyps und der transgenen Pappeln durchgeführt. Es wurde je ein Vertreter des Wildtyps, ABA3-Überexprimierer, der AO und ABA3-knock downs gefärbt (Abb. 64).

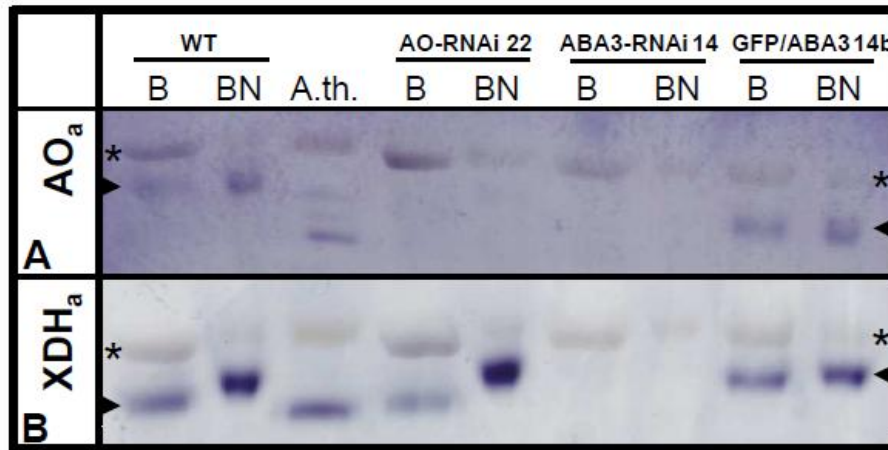


Abb. 64: Aktivitäten im ganzen Blatt (B) und der Blattnervatur (BN) im Vergleich. Auf den Färbungsgelen ist je ein Vertreter der in 3.2 beschriebenen transgenen Pappeln (mit Ausnahme der Promoter-Konstrukte) und des Wildtyps (WT) zu finden (AO-RNAi 22, ABA3-RNAi 14 und GFP/ABA3 14b). Auf Grund des schrägen Verlauf sind die spezifischen (Pfeil) und unspezifischen (*) Banden beidseits markiert. In (A) ist die AO- und in (B) die XDH-Aktivität zu finden.

Sowohl die AO- (Abb. 64 A) als auch die XDH-Aktivität (Abb. 64 B) sind in der Nervatur stark erhöht. Dies ist bei der XDH deutlicher zu sehen als bei der AO. Trotz der gesteigerten Aktivitäten sind die AO-Aktivitäten bei den AO und ABA3 knock downs nicht nachzuweisen, genauso wie die XDH keine Banden bei der ABA3-RNAi Nr. 14 produziert. In Abb. 64 B ist auffällig, dass die XDH-Bande in der Blattnervatur des Wildtyps, der AO-RNAi 22 und GFP/ABA3 14b nach oben verschoben sind. Dieses Phänomen tritt auf, wenn sich die XDH-Banden in der Aktivität stark unterscheiden. Eine Bande mit einer höheren Aktivität läuft ein wenig weiter oben. Verstärkt wird dieser Eindruck noch zusätzlich durch den leicht schrägen Verlauf des Gels. Auf Grund der erhöhten Aktivitäten wurde der ABA-Gehalt von diesen Pflanzen bestimmt (Abb. 65).

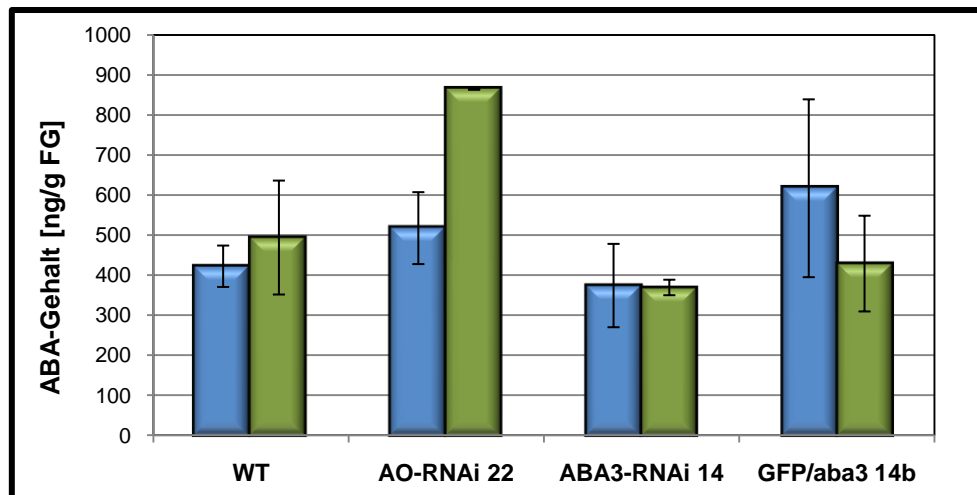


Abb. 65: ABA-Gehalt im ganzen Blatt und der Blattnervatur im Vergleich. Die zugehörigen Aktivitäten sind in Abb. 64 dargestellt. Die blauen Säulen zeigen die ABA-Werte im ganzen Blatt, die grünen die der Nervatur.

Beim Vergleich der Gehalte des gesamten Blattes und der Nervatur sind kaum Unterschiede zu beobachten. Die Werte liegen im Bereich von 500 ng ABA/g FG. Nur bei AO-RNAi 22 zeigt sich ein höherer Wert in der Nervatur. Alle anderen Pflanzen sind die Gehalte sehr ähnlich, auch ABA3-RNAi 14, bei der ein ähnliches Verhalten in der ABA-Produktion wie bei Nr. 22 zu erwarten wäre. So kann hier von einem Ausreißer ausgegangen werden.

2.9 Microarray-Analysen

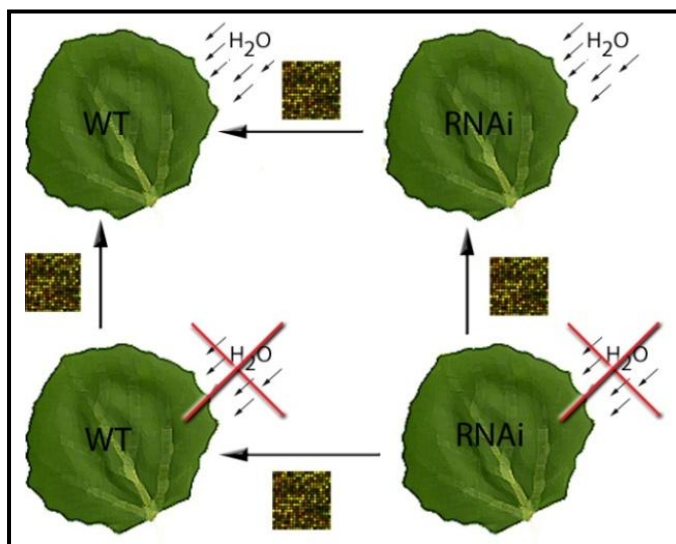


Abb. 66: Schematische Darstellung der verglichenen Proben (Hamisch, 2009)

wurden immer zwei Proben gegenübergestellt. Die Gene sind nach der Stärke der Expressionsunterschiede sortiert, nach dem *logfc* (*logarithmischen fold change*) zur Basis 2. An diesem Wert ist demnach zu erkennen, um ein wievielfaches das betrachtete Gen hoch-

Neben den Proteinuntersuchungen und der Bestimmung der ABA-Mengen sollte auch eine Transkriptuntersuchung der ABA-Biosynthesegene und der an der ABA-vermittelten Signaltransduktion beteiligten Gene mittels Microarray-Analyse durchgeführt werden. Dafür wurden eine Kontrolle des Wildtyps (WT_K) und der ABA3-RNAi Nr. 4 (4_K) mit getrockneten Proben verglichen, die auf 80% ihres ursprünglichen Frischgewichts reduziert wurden (WT_80 und 4_80). Bei der Auswertung

bzw. herunterreguliert ist. Bei einem negativer *logfc* ist das entsprechende Gen im Vergleichspartner hochreguliert. Die Darstellung WT_K_WT_80 bedeutet beispielsweise die vergleichende Darstellung von WT_K mit WT_80. Ist die Expression eines Gens in WT_80 hochreguliert im Vergleich zu WT_K, dann ist der *logfc* negativ. Ist jedoch der *logfc* positiv, dann ist das Gentranskript im WT_80 reduziert (Hamisch, 2009).

2.9.1 Transkriptuntersuchungen der ABA-Biosynthesegene

Die NCED ist im Vergleich zwischen Trockenstress und Kontrolle sowohl in der ABA3-RNAi 4 (siebenfach) als auch dem Wildtyp (*logfc*=5,3) hochreguliert. Im Vergleich der beiden Kontrollen (WT_K und 4_K) ist die NCED nicht unterschiedlich exprimiert, jedoch im Vergleich beider Trockenstressproben (4_80 und WT_80) ist dieses Enzym um das 3,6fache in der ABA3-RNAi-Pflanze hochreguliert. Demnach wird die NCED besonders in der gestressten ABA3-RNAi-Pflanze vermehrt exprimiert.

Die AO, ABA2 (Short-Chain-Dehydrogenase/Reduktase), ABA3 (Cysteindesulfurase) und die ZEP als wichtige ABA-Biosynthesegene werden hingegen durch Trockenstress sowohl im Wildtyp als auch bei der RNAi-Pflanze nicht unterschiedlich exprimiert.

Da für Tomate die Existenz eines alternativen Pathways, der die AO umgeht, beschrieben ist, sollte auch in den Transkriptuntersuchungen in Pappel überprüft werden, ob es Hinweise für diesen Pathway gibt. Auf Grund der Beteiligung einer P450-Cytochrom-Monooxygenase wurde auch dessen Expression betrachtet. Sie ist im Vergleich zwischen Trockenstress und Kontrolle sowohl in der ABA3-RNAi 4 (*logfc*=5,6) als auch dem Wildtyp (*logfc*=7,1) hochreguliert. In den Kontrollen ist das Transkript dieses Enzyms in der ABA3-RNAi-Pflanze induziert (*logfc*=3,9). Im Vergleich beider Trockenstressproben (4_80 und WT_80) ist das Transkript der P450-Cytochrom-Monooxygenase in der ABA3-RNAi-Pflanze gesteigert (*logfc*=4,6) und gleichzeitig reduziert (*logfc*=5,2) (Hamisch, 2009).

2.9.2. Transkriptuntersuchungen der ABA-vermittelten Signaltransduktion

Für *A. thaliana* ist eine Beteiligung von Phosphatasen vom Typ (PP2C) an der ABA-vermittelten Stressantwort bekannt. Diese sind in der gestressten ABA3-RNAi-Pflanze und des Wildtyps im Vergleich zur Kontrolle fünffach hochreguliert. Bei einem Vergleich beider Kontrollen ist diese hingegen in der knock down-Pflanze reduziert. Der Antagonist zu der PP2C ist der RCAR1 (Regulator Component of ABA Receptor 1). Allerdings waren keine Expressionsunterschiede zu bemerken.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen bei Signaltransduktionen im Allgemeinen und auch beim ABA-signaling eine wichtige Rolle. Jedoch konnte keine unterschiedliche Regu-

lierung von ROS produzierenden Proteinen durch den Trockenstress oder in der RNAi-Pflanze festgestellt werden.

Auch die Suche nach unterschiedlich regulierten Enzymen, die an der Inositol-Triphosphat Synthese beteiligt sind, lieferte keine Ergebnisse.

Die MAP-Kinase (MAPK) ist ebenfalls an der ABA-Signaltransduktion beteiligt. Dieses Enzym ist im gestressten Wildtyp (WT_80_WT_K) und in der ABA3-RNAi-Kontrolle im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (4_K_WT_K) bis zu fünffach reduziert (Hamisch, 2009).

2.10 Saisonaler Verlauf adulter Pappeln

Für die Untersuchung der Beteiligung von ABA an Wasserstress-Antworten waren auch adulte Pappeln von Interesse, die einem Jahreszyklus unterworfen sind.

Dafür wurden von Februar 2007 bis Februar 2008 wöchentlich Proben von zwei Pappeln genommen, die im Botanischen Garten Braunschweig stehen: *P. x canadensis* und *P. deltoides* (ungefähr 40 Jahre alt). Rinde wurde über den gesamten Zeitraum, Blattmaterial von Mai bis November 2007 geerntet. Von Ende Februar bis Anfang April konnten zusätzlich Blattknospen geerntet werden.

2.10.1 ABA-Gehalte im saisonalen Verlauf

Die ABA-Gehalte der Blattknospen wurden von drei Daten mit drei- und zweiwöchigen Abstand gemessen (Abb. 67). Die Werte liegen bei *P. x canadensis* um ungefähr das Zehnfache niedriger als bei *P. deltoides*.

Bei beiden Spezies zeigt sich aber dasselbe Bild. Der ABA-Gehalt nimmt ab. Bei *P. x canadensis* geschieht dies kontinuierlich, im Gegensatz dazu bleiben die Werte bei *P. deltoides* vom 27.02. und 20.03. gleich und sinken erst zum 03.04.

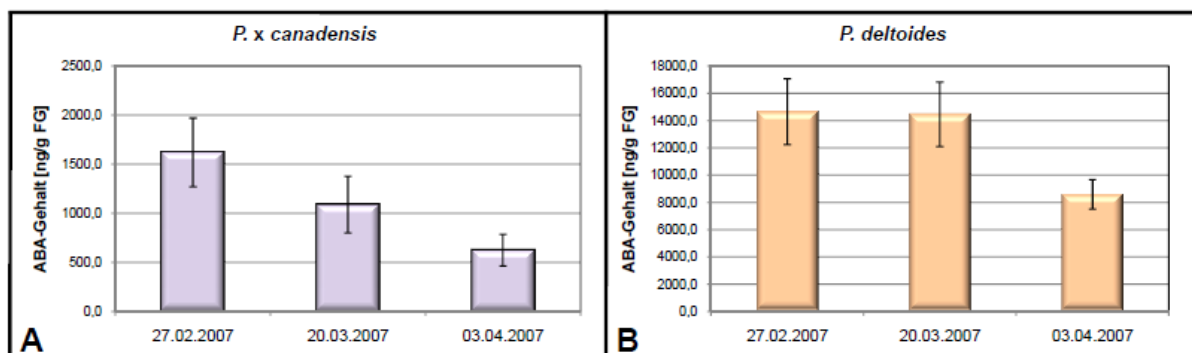


Abb. 67: ABA-Gehalte der Blattknospen von *P. x canadensis* (A) und *P. deltoides* (B). Die Werte wurden vom 27.02., 20.03. und 03.04.2007 bestimmt.

Es erfolgte die Bestimmung des ABA-Gehaltes auch im Phloem. Jedoch zeigten sich hier ähnliche Werte bei allen Daten und keinerlei Auffälligkeiten (Hamisch, 2008).

Die ABA-Gehalte von Rinde und Blättern sollten in beiden Pappelspezies gemessen werden. Dafür wurden Proben von der 8. bis zur 44. Kalenderwoche (Mitte Februar bis Anfang November 2007) gewählt, da so ein gesamter Zeitraum erfasst wird, der das Brechen der Dormanz und die gesamte Tragzeit der Blätter sowie Seneszenz im Herbst enthält. Die ABA-Gehalte der Proben aus jeder zweiten Woche wurden bestimmt und sind in Abb. 68 (Balken) zu sehen. In der Graphik sind auch die Wochenmittelwerte der Temperatur zu finden (Linie). Die Rinde beider Spezies (Abb. 68 A, B) enthalten am Anfang wenig ABA, jedoch gibt es ein Maximum im Sommer. Dieses ist bei *P. x canadensis* im Juni und Mitte August (25. und 33. Kalenderwoche) und bei *P. deltoides* Anfang August (31. Kalenderwoche) zu finden. Abgesehen von diesen Maxima liegen die ABA-Werte der Rinde über den gemessenen Zeitraum in einem ähnlichen Bereich und scheinen normalen Schwankungen zu unterliegen. In jungen, sich entwickelnden Blättern (Abb. 68 C, D) erhöht sich der ABA-Gehalt deutlich bei beiden Bäumen (*P. x canadensis*: Ende April, *P. deltoides*: Mitte April). Danach verringern sich die Werte in den Blättern und steigen dann kontinuierlich bis zum Sommer an. In der 34. Kalenderwoche (Ende August) gibt es bei beiden Spezies gleichermaßen ein Maximum. Dann sinken die Gehalte wieder und zeigen einen ähnlichen Verlauf zu den ebenfalls abnehmenden Temperaturen.

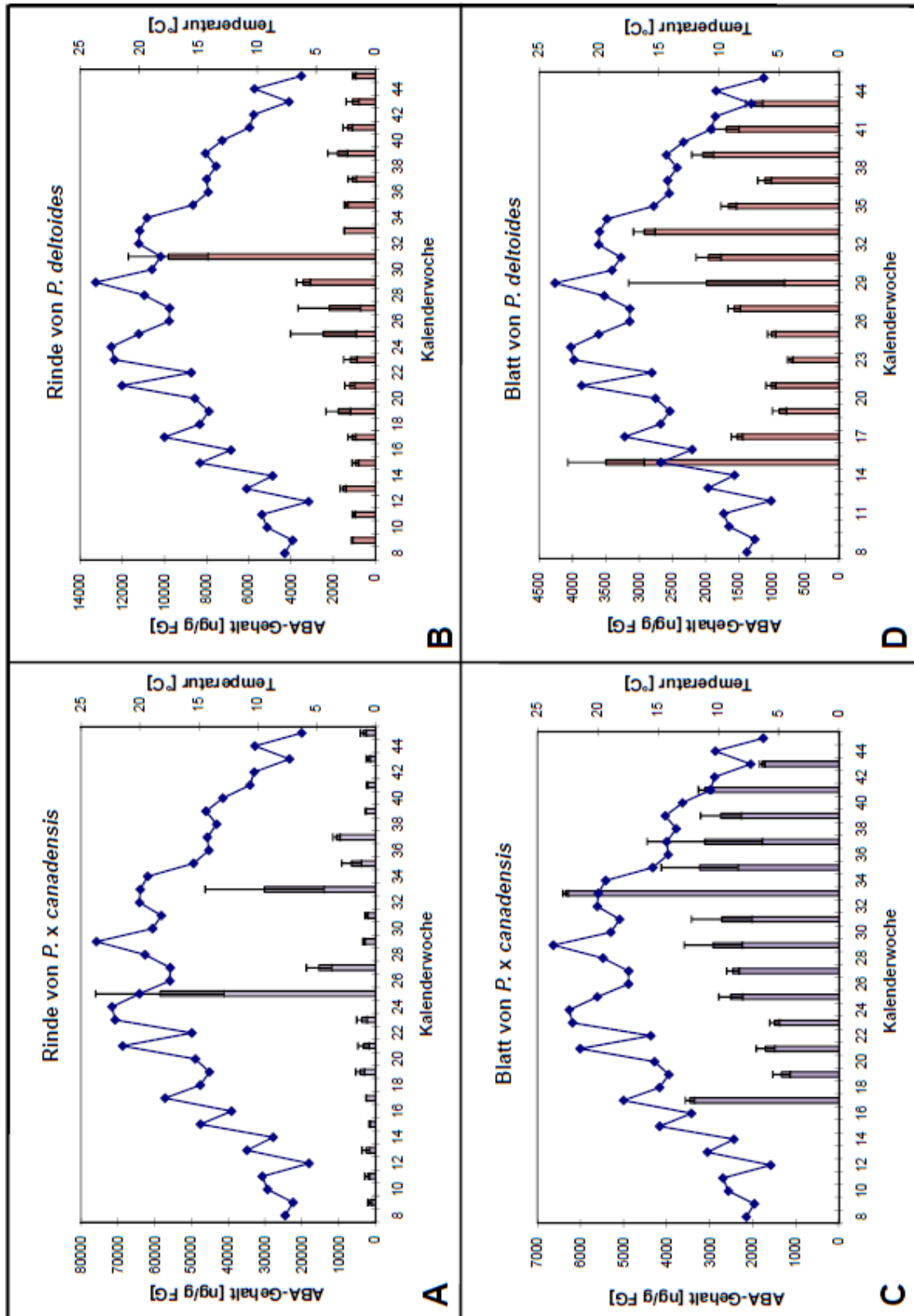


Abb. 68: Jahresgang des ABA-Gehaltes [ng/g FG] von Rinde und Blättern in zwei verschiedenen Pappel Arten (Säulen) und Lufttemperatur (Linie). (A) Rinde von *P. x canadensis*, (B) Rinde von *P. deltoides*, (C) Blätter von *P. x canadensis*, (D) Blätter von *P. deltoides*

2.10.2 AO- und XDH-Aktivitäten im saisonalen Verlauf

Die AO- und XDH-Aktivitäten im saisonalen Verlauf waren ebenfalls von Interesse. Die Aktivitätsfärbung war aber nur für *P. x canadensis* erfolgreich. Die Extrakterstellung aus den Blattproben von *P. deltoides* gelang nicht, denn es konnte keine ausreichend hohe Proteinkonzentration erzielt werden. Für eine Übersicht wurde Blattmaterial mit einem ungefähren Abstand von vier Wochen gewählt (Lau, 2009).

Hinsichtlich der AO-Aktivität (Abb. 69 A, schwarzer Pfeil) war auf Höhe der spezifischen Pappelbande nur ein leichter Schatten zu erkennen. Jedoch zeigte sich eine stärkere darunter liegende Bande (brauner Pfeil).

Eine äußerst starke XDH-Aktivität (Abb. 69) war in den jungen, sich entwickelnden Blättern zu erkennen (2.5./29.5.). Die Intensität der spezifischen Banden (schwarzer Pfeil) nimmt im Verlauf des Jahres immer mehr ab. Jedoch nimmt die Stärke eine darunter liegende Bande (brauner Pfeil) immer mehr zu.

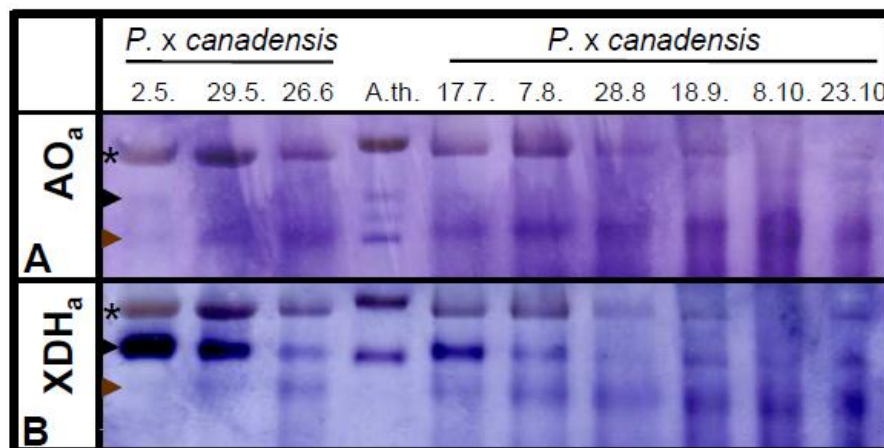


Abb. 69: AO- (A) und XDH-Aktivitäten (B) der Blätter im jahreszeitlichen Verlauf 2007 von *P. x canadensis*. Für eine Übersicht über die Veränderungen innerhalb der Blätter wurden Proben mit ca. vier Wochen Abstand hinsichtlich ihrer Aktivitäten getestet. Der schwarze Pfeil zeigt jeweils die spezifischen Banden der AO und XDH, während der braune eine unbekannte Bande zeigt. Die mit (*) markierten Banden zeigen die unspezifischen Banden.

Bei beiden Enzymen gibt es bei der adulten *P. x canadensis* eine unbekannte Bande, die unterhalb der spezifischen liegt. Inwieweit es sich darum um jeweils eine zweite spezifische Färbung handelt, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

3.0 Diskussion

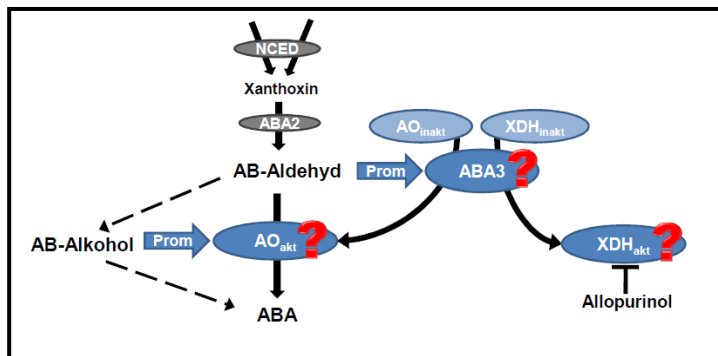
Pflanzen sind weltweit zahlreichen abiotischen Stressoren ausgesetzt, insbesondere hohe Salinität und Trockenheit schränkt das Pflanzenwachstum stark ein bzw. führt zum Totalverlust ganzer Pflanzengemeinschaften. Davon sind auch Pflanzen, die u.a. für Nahrungsmittel, Energiegewinnung, Papierherstellung und Baumaterial genutzt werden, betroffen. Das Ziel der pflanzlichen Gentechnik besteht also in der Resistenz-/Toleranzverbesserung gegen solche Stresssituationen, um diese Verluste zu verringern. Bedingt durch die veränderte Situation ist die Expression bestimmter Proteine nötig, die helfen, Schäden zu minimieren. Diese Expression und komplexe Regulation wird letztlich über unterschiedliche Modulatoren ausgelöst, zu diesen zählt u.a. das Phytohormon Abscisinsäure (ABA). ABA ist als Stresshormon bekannt und sorgt für die Aufrechterhaltung der osmotischen Homöostase unter Wasserstresssituationen (Finkelstein and Rock, 2002; Xiong and Zhu, 2003). Die Regulation der ABA-Biosynthese ist bisher hauptsächlich in *A. thaliana* auf transkriptioneller Ebene untersucht worden (Nambara and Marion-Poll, 2005). Obwohl das Enzym Neun-cis-epoxycarotenoid-Dioxygenase (NCED) den Hauptkontrollpunkt der Biosynthese in krautigen Pflanzen katalysiert (Iuchi et al., 2001; Qin and Zeveaart, 2002; Tan et al., 2003), sind auch regulatorische Effekte auf die ABA-Synthese durch die Aldehydoxidase (AO) dokumentiert (Melhorn et al., 2008). Die AO katalysiert die Umwandlung von Abscisinaldehyd (AB-Aldehyd) zu ABA und stellt somit den letzten Schritt der Synthese dar. Die Notwendigkeit einer posttranslationalen Aktivierung der AO erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Limitierung der ABA-Biosynthese (Schwartz et al., 1997). In den Stomata von *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der AO zu einem verstärkten Schluss der Spaltöffnung führt. Aus diesem Grund ist eine regulatorische Rolle der AO in der ABA-Biosynthese zu vermuten (Melhorn et al., 2008). Erhöhte Expressionsraten der AO sind unter Stress nachgewiesen worden, jedoch sind die Aussagen über Aktivitätserhöhungen kontrovers (Zdunek-Zastocka et al., 2004).

Für den Modellorganismus Pappel gibt es kaum Informationen zur Regulation der ABA-Biosynthese. Es wird allgemein angenommen, dass ABA auf demselben Weg synthetisiert wird, der aus *A. thaliana* bekannt ist. Jedoch existieren keinerlei Erkenntnisse darüber, ob in *Populus* die Oxidation von AB-Aldehyd Einfluss auf die Synthese von ABA hat, wie für *A. thaliana* vermutet.

In der vorliegenden Arbeit werden zum ersten Mal *in-silico*-Untersuchungen, genetische Modifikationen der wesentlichen Enzyme und die damit verbundenen Expressions- und Aktivitätsstudien des letzten Schrittes der ABA-Biosynthese in *Populus* gezeigt.

3.1 *In-silico*-Analyse

Die bisherigen Informationen über die ABA-Biosynthese wurden in erster Linie in *A. thaliana* gewonnen. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit die für den letzten Schritt der ABA-Synthese wichtigen Gene aus Pappel intensiv untersucht und die in *Populus* gemachten Beobachtungen mit *Arabidopsis* vergleichend dargestellt werden.



Die AO kommt in verschiedenen Isoformen vor (Koshiba et al., 1996; Omarov et al., 1999; Seo et al., 1998). In *A. thaliana* sind vier Isoformen bekannt (Seo et al., 2000a), die AAO1, AAO2, AAO3 und die AAO4. Im Gegensatz zu Arabidopsis können in

P. trichocarpa nur zwei full-length cDNAs der AO gefunden werden: die PtAO1 und PtAO2. Diese teilen eine Identität der Proteinsequenz von 74,5% untereinander. Die Identitäten mit den Arabidopsis AOs betragen ungefähr 60%. Im direkten Vergleich der PtAOs mit den AAOs zeigen sich trotz vieler Unterschiede die gleichen Domänen in Populus: das Fe-S-Cluster, die FAD- und die Moco/Dimerisierungs-Domäne. Diese sind sowohl in Populus als auch in Arabidopsis hoch konserviert und liegen interessanterweise an den nahezu identischen Aminosäurepositionen. Trotz einiger Unterschiede in der Sequenz ist auf Grund der stark konservierten AO-Domänen davon auszugehen, dass eine AAO auch in Populus aktiv ist. Neben den beiden full-length AOs sind in *P. trichocarpa* zwei weitere trunkierte Isoformen der AO zu finden: die PtAO3 und die PtAO4. Die PtAO3 besitzt nur einen Teil der Moco/Dimerisierungs-Domäne und die PtAO4 lediglich ein unvollständiges Fe-S-Cluster. Da die Redoxzentren unverzichtbar für die enzymatische Aktivität der AO sind, können diese trunkierten Versionen enzymatisch nicht aktiv sein. Bei Alignments der beiden trunkierten mit den full-length cDNAs zeigen sich hohe Identitäten der PtAO3 und PtAO4 ausschließlich zur PtAO1. Bei der PtAO3 und PtAO4 könnte es sich möglicherweise um Duplikationen von Sequenzbereichen der PtAO1 handeln. Im Gegensatz zu Arabidopsis ist also in Populus nur von zwei Isoformen auszugehen.

In Arabidopsis soll der finale ABA-Biosyntheseschritt von der AAO3 katalysiert werden (Seo et al., 2000b). Anhand der Alignments mit der AAO3 kann aber nicht geschlussfolgert werden, ob in Pappel dies durch die PtAO1 oder PtAO2 geschieht. Denn sowohl die PtAO1 als auch die PtAO2 weisen die höchste Identität unter allen Arabidopsis AOs mit der AAO3 auf und entsprechen einander mit 62,1% (PtAO1) und 61,4% (PtAO2), so dass hier keine Zuordnung getroffen werden kann.

Für den letzten ABA-Biosyntheseschritt ist in erster Linie die AO von Bedeutung. Jedoch besitzt die AO ein Schwesterenzym, die Xanthindehydrogenase (XDH). Auf Grund hoher Sequenzidentitäten sollen sich beide aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben (Schwarz and Mendel, 2006). Für *Populus* existieren keinerlei Kenntnisse, inwiefern sich beide Enzyme ergänzen und ob die Möglichkeit einer teilweisen Funktionsübernahme besteht. Deshalb wurde sowohl bei den *in-silico*-Analysen als auch den späteren Proteinuntersuchungen die XDH miteinbezogen.

Genau wie in *Arabidopsis* sind auch in *P. trichocarpa* zwei Isoformen der XDH zu finden. Beide Isoformen in *Arabidopsis* teilen eine 93%ige Identität (Hesberg et al., 2004). Im Gegensatz zu *Arabidopsis* existiert in *Populus* jedoch nur eine full-length XDH: die PtXDH1. Eine mögliche PtXDH2 ist extrem verkürzt und besitzt nur eine geringe Identität von 11,8% mit der PtXDH1. Beim Alignment der einzelnen Domänen mit der PtXDH2 weist diese zwar die höchste Übereinstimmung mit einem Teil der Moco/Dimerisierungs-Domäne auf, jedoch sind auch hier zahlreiche Unterschiede erkennbar.

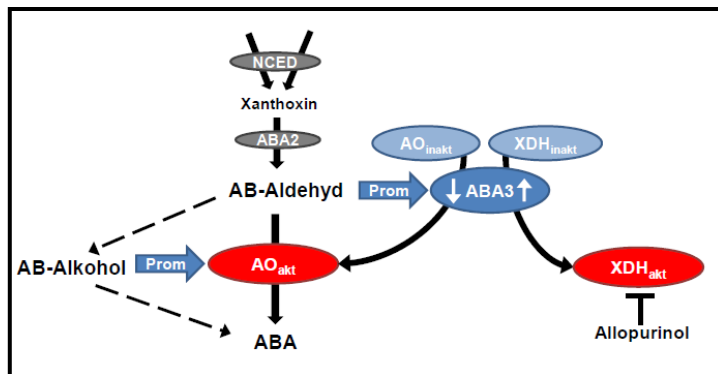
Die Identität zwischen der PtXDH1 und den beiden AXDHs ist mit 76,9% und 75,6% sehr hoch. Der Vergleich der Domänenstruktur der AXDH1 mit der PtXDH1 zeigt eine einheitliche Lage der Domänen, so dass man von einer hohen Konservierung der XDH ausgegangen werden kann. Die beiden Enzyme sollten also ähnliche Eigenschaften besitzen.

Die AO und XDH benötigen eine finale Sulfurierung des Mocos für ihre Aktivität. Ohne diese Sulfurierung bleiben die AO und XDH inaktiv. Die Moco-Sulfurase ABA3 katalysiert diese Reaktion. Aus diesem Grund ist auch ABA3 von großem Interesse.

Mit Hilfe der Sequenz der ABA3 aus *Arabidopsis* (AABA3) konnte die PtABA3-Sequenz in der *P. trichocarpa*-Datenbank identifiziert werden. Es konnte nur ein PtABA3-Gen gefunden werden; auch in *Arabidopsis*, Tomate und Reis ist ABA3 nur als single-copy-gene vorhanden (Huang et al., 2009; Sagi et al., 2002; Xiong et al., 2001). Die Berechnung der Größe der PtABA3 ergab 91,2 kDa und damit eine nahezu identische Größe im Vergleich zur AABA3 (91,8 kDa). Jedoch teilen beide Enzyme nur eine Identität von 55,6%. Auch die Moco-Sulfurase aus Reis teilt nur eine geringe Identität mit *Arabidopsis* von 53% (Huang et al., 2009). AABA3 besteht aus zwei Domänen, dem N-Terminus (NifS-like-Domain) und dem C-Terminus (Bittner et al., 2001). Diese Einteilung konnte auch in *Populus* mittels Sequenzvergleichen gefunden werden. Jedoch ist die NifS-like Domain in Pappel um 16 Aminosäuren länger. Der C-Terminus besitzt eine Größe von 302 Aminosäuren und ist damit etwas kleiner als der C-Terminus von AABA3 (320 Aminosäuren). Im Alignment der Proteinsequenz sind viele konservierte Abschnitte zu erkennen, auch Bereiche des putativen PLP-bindenden-Motivs und des putativen Cystein-Motivs konnten identifiziert werden. Insgesamt zeigt sich

ein ähnlicher Aufbau der Mocosulfurase, so dass von ähnlichen Eigenschaften, sowie von der Funktionalität der AABA3 in *Populus* ausgegangen werden kann.

3.2 Erzeugung und Charakterisierung transgener *P. x canescens*



Etablierung der AO und XDH *in- gel* Färbung bei Pappel.

Für die Untersuchung der Regulierung der ABA-Biosynthese in *Populus* waren Aktivitätsmessungen der AO und der XDH unverzichtbar. Jedoch war die Aktivitätsmessung mittels eines *in-gel*

Assays nach Koshiha et al. (1996) und Hesberg et al. (2004) bisher nur mit Material von krautigen Pflanzen durchführbar. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Färbung erstmalig auch für Pappel etabliert werden.

Die komplette Entfernung aller Zellbruchstücke nach dem Zellaufbruch stellte sich dabei als entscheidend heraus, denn sie stören das *in-gel*-Laufverhalten der Proben in der nativen PAGE und die spätere Farbreaktion erheblich.

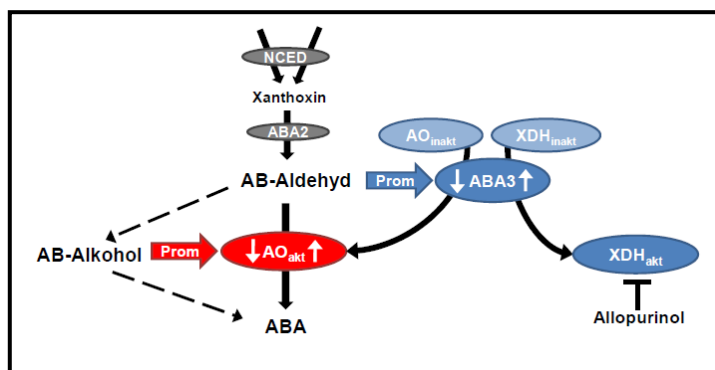
Besonders Blätter von Pflanzen, die in Hydroponik-Kultur gewachsen sind, eigneten sich schlecht als Material für die Aktivitätsmessung. Hier waren sekundäre Pflanzenstoffe, insbesondere die für Pappel typischen Polyphenole, stark enthalten, welche die Färbungsintensität stark beeinflussen. Gerade die Gattung *Populus* besitzt eine reiche Anzahl von verschiedenen phenolischen Inhaltsstoffen, die möglicherweise an der Resistenz gegen Herbivore beteiligt sind (Constabel et al., 2000). Erst unter Einsatz von PVPP konnte eine Minimierung der Polyphenole erzielt werden. Der Feststoff bindet diese sekundären Pflanzenstoffe und ermöglicht deren Entfernung bei Zugabe und späterer Trennung durch Zentrifugation.

Da es sich bei diesem *in-gel*-Assay auch weiterhin nicht um eine Routinemethode handelt, wurde als interner Standard Material eines unbehandelten *A. thaliana* Blattes verwendet. Dies erlaubt die Abschätzung der Gelqualität, sowie die Vergleichbarkeit der Färbungen verschiedener Gele.

In Arabidopsis zeigen sich drei spezifische AO-Banden. Die oberste stellt ein Homodimer der AAO3, die unterste ein Homodimer der AAO2 und die mittlere ein Heterodimer aus AAO2 und AAO3 dar (Seo et al., 2000a). Oberhalb dieser Banden ist eine unspezifische Dehydrogenase-Bande zu finden (pers. Mitteilung F. Bittner), die sich auch farblich von den

spezifischen AO-Banden unterscheidet. Im Gegensatz dazu kann bei Pappel nur eine spezifische Bande detektiert werden, die ungefähr auf der Höhe der AAO3 in Arabidopsis läuft. Ob es sich hierbei um diejenige PtAO handelt, die AB-Aldehyd zu ABA oxidiert, kann nur unter Verwendung von AB-Aldehyd als Substrat erfolgen (Seo et al., 2000b). Leider stand dieses für die hier durchgeführten Untersuchungen nicht zur Verfügung. Auch bei Pappel wird die unspezifische Dehydrogenase angefärbt.

Die Erzeugung transgener Pflanzen, die eine Modulation in der AO und ihres Aktivators, der Mocosulfurase ABA3, besitzen, war notwendig, um den Beitrag der entsprechenden Enzyme an der Regulation der ABA-Biosynthese in Populus zu ermitteln.



Genetische Modifikationen der AO.

Die AO wurde mit Hilfe eines RNAi-Konstruktes herunter reguliert. Zur Analyse und Charakterisierung der Transformanten wurde zunächst eine PCR durchgeführt. Hier zeigte sich das Vorhandensein des Kon-

struktes bei allen getesteten Pflanzen. Für die weiteren Experimente wurden die Linien 22, 35, 53 ausgewählt.

In Seo et al. (2000b) wird ein Transformant beschrieben, der einen Defekt im AAO3-Gen besitzt. Es handelt sich dabei um eine knock out-Mutante. Diese Pflanzen weisen einen welken Phänotyp auf. Dies war bei den AO-RNAi-Pflanzen nicht zu beobachten. Ferner sind diese Pflanzen morphologisch vom Wildtyp nicht zu unterscheiden. Die AO-Aktivität des AAO3-Mutanten wurde unter Nutzung zwei verschiedener Substrate gemessen: AB-Aldehyd und 1-Naphthaldehyd. Die AOs besitzen eine relativ breite Substratspezifität. Mit 1-Naphthaldehyd können alle der drei spezifischen AO-Banden in *A. thaliana* angefärbt werden. Bei Verwendung von AB-Aldehyd zeigt sich nur die oberste Bande Seo et al. (2000b). Auch bei Bittner et al. (2001) ist diese oberste Bande mit AB-Aldehyd deutlich angefärbt. Jedoch zeigen sowohl die mittlere als auch die unterste Bande eine schwache Färbintensität. Bei der AAO3-Mutante (Seo et al., 2000b) sind mit Einsatz von AB-Aldehyd keine Aktivitätsbanden sichtbar. Mit 1-Naphthaldehyd kann aber die mittlere und unterste AO-Bande angefärbt werden. Dennoch fehlt auch hier die oberste Bande.

Bei der Analyse der Populus-AO-RNAi-Pflanzen konnte durch eine RT-PCR ein Indiz für eine Reduktion des Transkriptes gegeben werden. Im Aktivitätsnachweis waren die spezifischen

AO-Banden nur als Schatten zu sehen, so dass hier von einer Aktivitätsreduktion ausgegangen werden kann. Da die XDH-Aktivität dabei unverändert blieb, regelt das eingebrachte RNAi-Fragment spezifisch die PtAO2 herunter und hat keinerlei Einfluss auf das Schwesterenzym. Inwieweit auch die PtAO1 betroffen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die AAO3 entspricht bei Arabidopsis der obersten Bande und bei Populus kann nur diese oberste angefärbt werden. Auf Grund des ähnlichen Laufverhaltens könnte es sich bei der PtAO2 um die Isoform handeln, die der AAO3 entspricht. Jedoch ist zur Bestätigung dieser Vermutung die Verwendung von AB-Aldehyd als Substrat nötig.

In der Arabidopsis-Mutante AAO3 wurde auch der Einfluss der Ausschaltung der AAO3 auf den ABA-Gehalt überprüft. Es zeigte sich eine drastische Auswirkung, denn der ABA-Gehalt sank in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp auf 37% bzw. 20% (Seo et al., 2000b).

Auf Grund dieser Beobachtung sollte auch in den Populus AO-RNAi-Pflanzen der ABA-Gehalt gemessen werden, um Effekte der herunter regulierten PtAO2 festzustellen. In den ersten Versuchen war bei den AO-RNAi-Pflanzen (Nr. 15, 17, 19, 22, 35 und 53) im unbehandelten Zustand ein reduzierter ABA-Gehalt von 50% des Wildtyps zu beobachten. Jedoch war in diversen Wiederholungen diese Reduktion nicht reproduzierbar, denn in den späteren Stressapplikationen lagen die ABA-Werte der AO knock down-Pflanzen im Bereich der Wildtyppflanzen. Bei den AO-RNAi-Pflanzen handelt es sich nicht um eine völlige Ausschaltung des PtAO2-Gens, wie dies bei den AAO3-Mutanten der Fall ist, sondern um eine Herabsetzung des Transkripts. Eine mögliche Begründung für den unveränderten ABA-Gehalt wäre, dass das restliche *ao*-Transkript ausreichend ist, um genug ABA für den ungestressten Zustand zu produzieren und sich deshalb keine Auswirkungen auf Produkt-ebene zeigen. Zum anderen kann an dieser Stelle nicht geklärt werden, ob es sich bei der PtAO2 wirklich um das Äquivalent der AAO3 handelt und damit die Oxidation von AB-Aldehyd katalysiert. Wenn dies die Aufgabe der anderen full-length AO sein sollte, die durch die Transkriptreduzierung möglicherweise nicht beeinflusst wird, wäre die Biosynthese von ABA nicht betroffen. Wenn aber wirklich die Hauptfunktion der PtAO2 die Oxidation von AB-Aldehyd sein sollte, ist es vielleicht der PtAO1 möglich, diese Aufgabe zum Teil zu übernehmen. Auch die ABA-Produktion über einen sogenannten Shunt Pathway ist in Diskussion (Rock et al., 1991; Seo et al., 2000b). Hierbei wird die Oxidation durch die AO umgangen, indem es erst zu einer Reduktion zu Abscisinalkohol kommt und dann die Oxidation zu ABA über eine Cytochrom-P450-Monooxygenase erfolgt. Des Weiteren ist für die Gattung Populus nicht bekannt, ob das Schwesterenzym der AO, die XDH, in der Lage ist teilweise Funktionen der AO zu übernehmen bzw. zu ergänzen. Für Arabidopsis ist dies jedoch nicht beschrieben (siehe dazu auch 3.4).

Neben einer Reduzierung der AO, um den Einfluss der AO auf die Regulation zu untersuchen, ist auch die Überexpression nötig. Für die Überexpression wurde ein Konstrukt be-

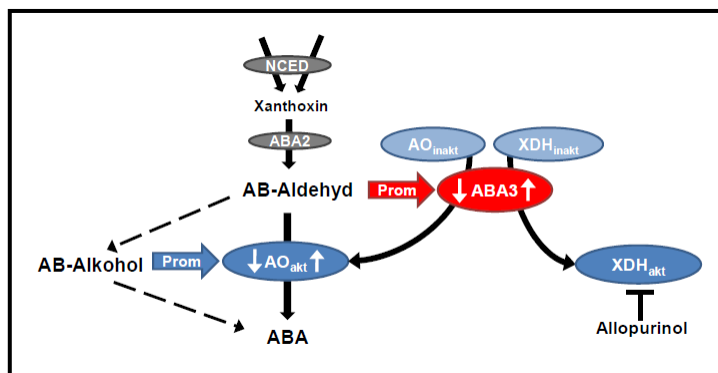
stehend aus dem 35S-Promoter, der AO3 aus *A. thaliana* und dem Terminator in die Pappel-Pflanzen eingebracht. Die AO3 wurde für dieses Konstrukt gewählt, weil diese Isoform nach Seo et al. (2000b) den finalen Schritt in der Biosynthese von ABA katalysieren soll.

Zuerst wurden die Pflanzen molekular auf die Existenz des Konstruktes überprüft. Bei allen getesteten Pflanzen konnte das entsprechende Fragment nachgewiesen werden. Die weitere Analyse sollte mittels Aktivitätsmessungen und immunologischen Nachweisen erfolgen. Hinsichtlich der AO-Aktivität waren keine Unterschiede zwischen den putativen AAO3-Überexprimierern und dem Wildtyp zu erkennen, da die Banden dieselbe Intensität aufwiesen. Bei einer Überexpression könnte eine Aktivitätserhöhung feststellbar sein. Da aber dieses Enzym erst durch ABA3 aktiviert wird und an dieser Stelle eine Regulationsmöglichkeit besteht (Schwartz et al., 1997), ist eine gleichbleibende Aktivität denkbar. Durch die Überexpression wird also nur der Anteil an Apoprotein erhöht. Aus diesem Grund sollte die gesteigerte Apoproteinkonzentration mit einem immunologischen Nachweis erfolgen. Um die verschiedenen Isoformen getrennt nachweisen zu können, wurde eine native PAGE durchgeführt, in der die Isoformen unterschiedliches Laufverhalten besitzen. Für den immunologischen Nachweis wurde ein AAO1-Antikörper genutzt. Der AAO1-Antikörper erkennt alle drei spezifischen AO-Banden, die in der Aktivitätsfärbung von *A. thaliana* auftreten. Da es sich bei der überexprimierten AAO3 um ein Arabidopsis-Protein handelt, war eine Bandenerkennung im *P. x canescens*-Extrakt zu erwarten. Jedoch ist in den Pappelproben nur ein Schatten auf Höhe der obersten spezifischen Bande zu sehen. Es ist kein Unterschied zwischen den putativen AAO3-Überexprimierern und dem Populus-Wildtyp erkennbar. Dies ist möglicherweise auf den Antikörper zurückzuführen, dessen Färbung auch bei Arabidopsis schwach ist. Andererseits könnte es auf Schwierigkeiten bei der Detektion mit Pappelextrakt zurückzuführen sein.

Zur Zeit der Erstellung der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung AAO3-überexprimierender Transformanten für nachfolgende Stressexperimente nicht möglich. Obwohl das Konstrukt in allen untersuchten Transformanten nachgewiesen werden konnte, war weder eine Aktivitätsveränderung im unbehandelten Zustand noch eine Konzentrationserhöhung des Apoproteins zu sehen. Aus diesem Grund wurde die tatsächliche Expression mittels RT-PCR (reverse Transkriptase-PCR) nachgewiesen. Bisher konnten fünf Pflanzen identifiziert werden, die die AAO3 exprimieren. In Stresssituationen, u.a. Salz- und Trockenstress, kommt es zur Steigerung der ABA3-Expression in *A. thaliana* (Xiong et al., 2001), wodurch eine Aktivitätssteigerung der AO verursacht werden könnte. Wenn die putativen AAO3-Überexprimierer demnach einem Stress ausgesetzt werden, könnte die AO-Aktivität besonders in den Transformanten durch den höheren Anteil an Apoprotein gesteigert sein. Im ungestressten Zustand ist eine gleichbleibende Aktivität durch eine unveränderte Konzentration von ABA3 wahrscheinlich. Demnach sollten in folgenden Untersuchungen die AAO3

exprimierenden Pflanzen gestresst werden und ihr ABA-Gehalt im denen des Wildtyps verglichen werden.

Da das Ziel der vorliegenden Arbeit eine vergleichende Darstellung zwischen *Arabidopsis* und *Populus* ist, sollten auch Induktionsstudien mit Hilfe von Promoterkonstrukten durchgeführt werden. Für Analysen auf Transkriptionsebene der AO konnte ein Konstrukt kloniert werden, indem ein ca. 1,5 kb großer Bereich upstream der PtAO2-Sequenz mit dem Reportergen GUS fusioniert wurde. Die Funktionalität des Konstruktes konnte mittels Infiltration in *N. benthamiana* gezeigt werden. Da sich der transformierte Kallus zur Zeit der Erstellung dieser Arbeit noch in der Regenerationsphase befand, konnten keinerlei Untersuchungen mit diesem Konstrukt in Pappel durchgeführt werden. Es sind also keine Aussagen über organspezifische oder verstärkte Expression unter verschiedenen Stresssituationen zu diesem Zeitpunkt möglich. Diese Experimente sind die Aufgabe nachfolgender Arbeiten.



Genetische Modifikationen von ABA3.

Auch der Einfluss der Moco-Sulfurase ABA3 auf die ABA-Biosynthese galt es zu untersuchen. Da die AO erst durch ABA3 in ihre aktive Form überführt wird, ist hier ein Regulationspunkt

wahrscheinlich (Schwartz et al., 1997). Es wurden knock down-Pflanzen mittels RNAi-Technik und Überexprimierer erzeugt.

Für das RNAi-Konstrukt wurden zwei Exone aus *P. trichocarpa* mittels Fusions-PCR vereinigt. Diese dienten als sense und, in umgekehrter Orientierung, als antisense Fragment. Mittels PCR konnte die Existenz des Fragments in den ausgewählten Pflanzen 4, 7 und 14 nachgewiesen werden. Eine Reduzierung der mRNA von ABA3 als Aktivator der AO und XDH sollte drastische Auswirkungen auf deren Aktivität haben. Für *Arabidopsis* sind ABA3 knock out-Mutanten bekannt (Schwartz et al., 1997; Xiong et al., 2001), bei denen solch dramatische Effekte zu beobachten sind. In Schwartz et al. (1997) sind Aktivitätsmessungen mittels des *in-gel*-Assays durchgeführt worden. Die im Locus *aba3* defekte Mutante zeigte weder eine AO-Aktivität irgendeiner Isoform noch war die XDH nachweisbar. Deshalb sollten auch die ABA3-RNAi-Pflanzen hinsichtlich ihrer Aktivitäten getestet werden. Im Gegensatz zur *Arabidopsis*-Mutante handelt es sich hier nicht um eine komplette Ausschaltung des Gens, sondern um eine Reduzierung der mRNA von ABA3. Da ein Protein ABA3 in der Lage ist, mehrere AO- bzw. XDH-Proteine zu aktivieren, war hier nicht von denselben Auswirk-

ungen auszugehen, wie sie in der Arabidopsis ABA3-Mutante zu beobachten waren. Vielmehr wurde lediglich eine Reduzierung der AO- und der XDH-Aktivitäten erwartet, wie sie ebenfalls bei der AO in den AO-RNAi-Pflanzen beobachtet wurde. Tatsächlich waren die Aktivitäten beider Enzyme im unbehandelten Zustand nicht nachweisbar. Auch bei mehreren Wiederholungen war keine Färbung zu erreichen. Aus diesem Grund ist von einem positiven RNAi-Effekt auszugehen, dessen Effektivität als sehr hoch anzusehen ist. Obwohl das Transkript in Pappel nicht vollständig eliminiert wurde, wie dies in den Arabidopsis knock out-Pflanzen der Fall ist, zeigen beide Transformanten den gleichen Aktivitäts-Phänotyp.

Außerdem sollten die Auswirkungen einer nicht nachweisbaren AO-Aktivität auf den ABA-Gehalt bestimmt werden. Zusätzlich zu den Pflanzen ohne Aktivität wurde der Gehalt zum Vergleich von zwei verschiedenen Wildtyp-Pflanzen und zwei ABA3-RNAi-Pflanzen bestimmt, bei denen die Aktivitäten nicht reduziert waren. Die Werte beider Gruppen lagen im identischen Bereich. Daraus folgt, dass die Höhe des ABA-Gehaltes im unbehandelten Zustand durch die nicht nachweisbare AO- und XDH-Aktivität nicht beeinflusst wird. Dies ist auch schon bei der Analyse der AO-RNAi-Pflanzen beobachtet worden. In Leon-Kloosterziel et al. (1996) wird eine Arabidopsis-Mutante mit dem Genotyp *aba3-1* analysiert, die auch einen Fehler in der Mocosulfurase besitzt. Hier betrug der gemessene ABA-Gehalt im unbehandelten Zustand in der Mutante ungefähr 31% im Vergleich zum Wildtyp. Der Defekt von ABA3 wirkte sich hier also dramatisch aus, wohingegen die Populus-Transformanten keinen Effekt zeigten. Ein unveränderter ABA-Gehalt war schon in den AO-RNAi-Pflanzen zu beobachten, jedoch bestand hier die Möglichkeit, dass die PtAO1 die Funktion der PtAO2 teilweise übernimmt. Bei einer Reduzierung der ABA3 sind jedoch alle AO-Isoformen und auch die XDH betroffen. Durch die nicht vollständige Eliminierung von ABA3 ist wahrscheinlich eine geringe Restaktivität der AO und der XDH vorhanden. Obwohl diese nicht mit dem *in-gel*-Assay nachweisbar sind, genügen sie möglicherweise im ungestressten Zustand, um den basalen ABA-Gehalt zu produzieren. Erst in Stresssituationen sind eventuell die Unterschiede erkennbar. Für die ABA3-Mutante aus Arabidopsis ist ein welcher Phänotyp beschrieben (Xiong et al., 2001), während die ABA3-RNAi-Pflanzen sich morphologisch nicht vom Wildtyp unterscheiden lassen.

Neben der Reduktion von ABA3 sollten auch überexprimierende Pflanzen erzeugt werden. PtABA3 und AABA3 teilen eine 55,6%ige Identität und viele konservierte Bereiche wie das PLP-bindende und das Cysteinmotiv. Deshalb erscheint die Funktionalität des Arabidopsis-Proteins in Populus wahrscheinlich.

Für die Überexpression von ABA3 wurde ein Konstrukt bestehend aus GFP und der Arabidopsis *aba3* cDNA unter der Kontrolle des 35S-Promoters in Pappel transformiert. Die Existenz des eingebrachten Konstruktes wurde mit PCR überprüft und konnte bei den ausgewählten Pflanzen Nr. 6, 14b und 28 nachgewiesen werden. Die Kontrolle der Expression

mittels immunologischen Nachweis zeigte sowohl mit einem GFP- als auch ABA3-Antikörper eine Bande, die der Größe des Fusionsprodukts von GFP und ABA3 mit 117 kDa entspricht. Die Expression konnte auch am LSM gezeigt werden, denn eine für GFP typische Fluoreszenz bei 515 nm war feststellbar. Eine cytoplasmatische Lokalisierung war zu erkennen. Jedoch unterschieden sich junge und alte Blätter. In jungen Blättern war eine Fluoreszenz in allen Epidermiszellen und den Spaltöffnungen zu erkennen, wohingegen in älteren Blättern nur die Stomata GFP aufwiesen. Dieses Phänomen kann an dieser Stelle nicht final geklärt werden. Da die Expression des Konstrukts von einem 35S-Promoter gesteuert wird, wäre eine organ- und entwicklungsunabhängige Expression zu erwarten.

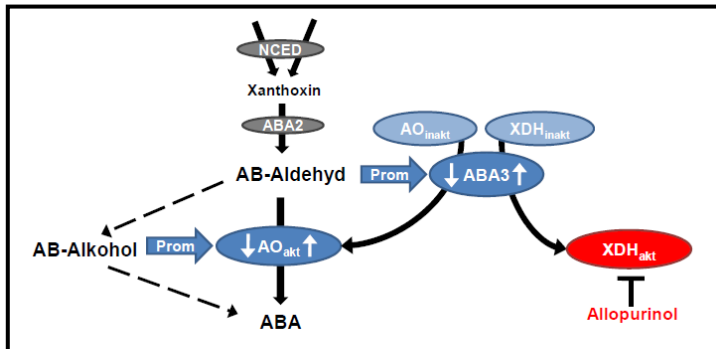
Obwohl die Expression nachgewiesen werden konnte, sind keinerlei Veränderungen in den Aktivitäten der AO und XDH im unbehandelten Zustand erkennbar. Bei einer Überexpression von ABA3 könnte eine Erhöhung der Aktivitäten erwartet werden: wenn der Aktivator vermehrt vorliegt, wäre eine erhöhte Sulfurierung des Mocos der AO und XDH denkbar. Bei Analyse des ABA-Gehaltes lagen die Werte der Transformanten im Bereich des Wildtypen. Auch an dieser Stelle waren keine Auswirkungen der genetischen Modulation auf den ABA-Gehalt feststellbar.

Im Gegensatz zu den knock down-Pflanzen können die ABA3-Überexprimierer nicht mit Arabidopsis-Ansätzen verglichen werden. Zwar ist versucht worden, genau dieses Konstrukt in Arabidopsis zu transformieren, jedoch konnte keine Pflanze regeneriert werden. Anscheinend ist dieses Konstrukt letal für Arabidopsis (pers. Mitteilung F.Bittner).

Für Promoterinduktionsstudien konnte ein 1,09 kb großer Abschnitt des Promoterbereiches von ABA3 mit dem Reportergen GUS fusioniert werden. Die regenerierten Pflanzen wurden hinsichtlich ihrer GUS-Aktivität getestet. Es zeigte sich insgesamt eine schwache GUS-Aktivität. Dies lässt darauf schließen, dass es sich um ein im unbehandelten Zustand schwach exprimiertes Gen handelt. Es wurden drei Pflanzen unterschiedlicher Kalluslinie (Nr. 8, 27 und 50) für die folgenden Untersuchungen ausgewählt. In den Transformanten konnte mittels PCR das eingebrachte Konstrukt in der genomischen DNA nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Laufe der vorliegenden Arbeit erstmalig Pappelpflanzen erzeugt wurden, die eine genetische Modulation im letzten Schritt der ABA-Biosynthese besitzen. Es gibt auch zu Arabidopsis wenige Untersuchungen, die sich mit der posttranslationalen Regulation der AO beschäftigen und für Pappel existieren bisher keinerlei Untersuchungen. Des Weiteren sind auch keine Daten zu AO- und ABA3-Promoterstudien veröffentlicht.

3.3 Stressapplikationen



Allopurinol-Hemmung der Populus-XDH.

Die XDH und die AO sind sehr nah verwandt, was sich aus demselben Aufbau der Domänen und einer hohen Identität schließen lässt (Schwarz and Mendel, 2006).

Außerdem benötigen beide eine

Sulfurierung des Mocos, um aktiv zu sein. Auf Grund des ähnlichen Aufbaus und vergleichbarer Eigenschaften wäre es denkbar, dass sie die Funktionen des anderen übernehmen können. Die XDH1 aus Arabidopsis setzt Hypoxanthin und Xanthin viel effizienter um als Aldehyde, die in erster Linie als Substrat für die AO dienen. Die höchste Aktivität ist mit Hypoxanthin zu erzielen, so dass die Aktivität hier gleich 100% gesetzt wurde. Allerdings konnte auch mit Einsatz verschiedener Aldehyde eine verringerte, jedoch deutliche Aktivität gezeigt werden. Die Verwendung von Indol-3-Carboxaldehyd ergab 31,3%, AB-Aldehyd wies 28,9% auf und Naphthaldehyd zeigte eine Aktivität von 27,5% (Hesberg et al., 2004). Dies würde auf eine Unterstützungsmöglichkeit der AO durch die XDH hinweisen, jedoch gibt es keine eindeutigen Untersuchungen dazu. Für Populus ist ebenfalls nicht bekannt, ob die beiden Enzyme sich ergänzen und die Funktion des anderen teilweise übernehmen können. Deshalb sollte die XDH in bestimmten Stresssituationen inhibiert werden, um die alleinige Auswirkung auf die AO-Aktivität zu testen.

Die XDH wird stark durch Allopurinol inhibiert, bei dem es sich um ein Analog von Hypoxanthin handelt (Okamoto et al., 2003) (Abb. 70). Allopurinol wurde vor 36 Jahren entwickelt (Elion et al., 1963). Der Inhibitor wird durch die XDH zu Alloxanthin umgewandelt, welches einen sehr stabilen Komplex mit dem Enzym bildet und so weitere Reaktionen mit Xanthin bzw. Hypoxanthin verhindert (Sauer et al., 2002). Diese Hemmung ist für die XDH spezifisch, denn ihr Schwesterenzym, die AO, wird dadurch nicht beeinflusst (Leydecker et al., 1995).

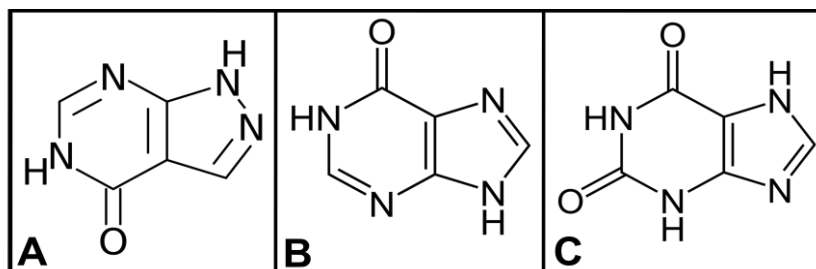


Abb. 70: Chemische Struktur des XDH-Hemmers Allopurinol (A) und der Substrate Hypoxanthin (B) und Xanthin (C)

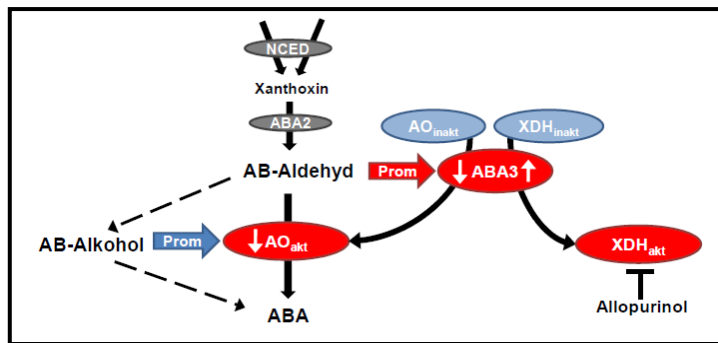
Allopurinol sollte die Populus-XDH *in-vivo* hemmen, dazu wurde der Inhibitor in das Medium gegeben, wo es durch die Wurzel in die Pflanze transportiert wurde.

Überraschenderweise zeigte sich aber eine Erhöhung der XDH-Aktivität durch Allopurinol. Es wurde vermutet, dass die Allopurinol-Konzentration in der Pflanze möglicherweise nicht ausreichte, um alle XDHs zu inhibieren. Außerdem könnte es durch die verringerte XDH-Aktivität zu einer Induktion der XDH-Expression gekommen sein, wodurch die erhöhte Aktivität begründet werden könnte.

Es erfolgte eine mehrfache Zugabe des Hemmstoffes, um eine konstant hohe Konzentration von Allopurinol in der Pflanze zu garantieren. In Leydecker et al. (1995) wurde die Inhibition der XDH durch eine Allopurinol-Konzentration von 200 μM erreicht. Demnach sollten die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von 130 μM bis 520 μM für eine Hemmung genügen. Jedoch war auch hier eine Induktion der XDH zu beobachten. Die Erhöhung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle war bei steigender Allopurinol-Konzentration sogar noch stärker. Dieser Effekt war nicht nur bei den Wildtypen, sondern auch bei den AO-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen zu beobachten, wohingegen die AO-Aktivität sich unbeeinflusst zeigt. An dieser Stelle kam die Frage auf, ob die Populus-XDH gegenüber Allopurinol sensitiv ist. Um dies zu überprüfen, wurden die nativen Trenngele vor der Färbung mit Allopurinol inkubiert und auch in der Färbelösung war der Hemmstoff vorhanden. Bei dieser Art der Applikation war eine Inhibition zu beobachten. Demnach ist auch die Populus-XDH sensitiv gegenüber Allopurinol. Jedoch muss bei der Aufnahme des Hemmstoffes durch die Wurzeln eine Umwandlung stattgefunden haben, dessen Produkt eine induzierende Wirkung auf die XDH hat. Denn wenn der Inhibitor unverändert in die Zellen gelangt wäre, hätte eine Hemmung der XDH beobachten werden müssen.

Die Behandlung mit Allopurinol eignet sich demnach nicht, um die XDH *in-vivo* zu inhibieren, da eine Aufnahme über die Wurzeln keinen hemmenden Effekt verursacht und nur ein direkter Kontakt in der Färbelösung zu einer Inhibition führt.

Es ist für Populus unbekannt, ob eine Beteiligung der XDH an der Bildung von ABA besteht. Aus diesem Grund wurde der ABA-Gehalt von den mit Allopurinol behandelten Proben bestimmt. Falls die XDH die AO in ihrer Funktion unterstützt, wäre ein Anstieg des ABA-Gehalts in den mit Allopurinol versetzten Pflanzen zu erwarten, denn hier war die Aktivität der XDH drastisch erhöht. Die ABA-Werte der Kontrollen und der behandelten Proben lagen aber im gleichen Bereich. Der Wildtyp zeigt sogar eine leichte Erniedrigung des Gehaltes durch den Inhibitor. Dies erlaubt also die Schlussfolgerung, dass die XDH keinen Einfluss auf die Bildung von ABA haben kann.



Effekte von ABA-Applikation auf die transgenen Pappeln.

Die Regulation vieler Stoffwechselwege geschieht über die Substrate oder Endprodukte. So steuert auch ABA über Feedbackmechanismen die eigene Biosynthese und Abbau

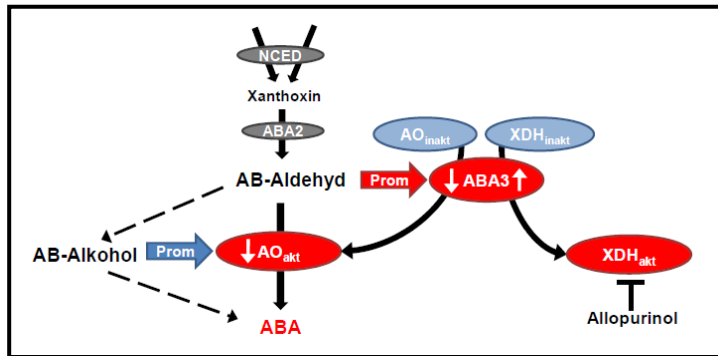
(Xiong and Zhu, 2003). Cutler und Krochko (1999) beschreiben die Aktivierung der katabolischen Enzyme bei ABA-Akkumulation. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass ABA die Aktivierung des Cytochrom P450-Enzyms ABA 8'-Hydrolase verursacht, welches den ersten Schritt des ABA-Katabolismus darstellt (Uknes and Ho, 1984). Die Überexpression der NCED führt zu einer ABA-Überproduktion, die zu einer Akkumulation des Abbauprodukts Phaseinsäure führt. Dem zufolge wird durch die Induktion des ABA-Katabolismus die Anreicherung durch ABA, zumindest im ungestressten Zustand, vermindert.

Die NCED konnte in Tomate (Thompson et al., 2000) und in der Augenbohne (Iuchi et al., 2000) nicht durch exogenes ABA induziert werden, so dass nur die Induktion des Abbaus und keine Auswirkungen auf die Synthese nachgewiesen werden konnten. Jedoch konnte in Arabidopsis gezeigt werden, dass die Zeoxanthin-Epoxidase (ZEP), ABA3 und die AAO3 durch ABA aktiviert werden (Xiong et al., 2001; Xiong et al., 2002).

Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob eine externe Zugabe von ABA einen Einfluss auf die AO-Aktivität und die Expression der PtAO2 hat. Dabei war keine Induktion der Populus-AO durch externe Zugabe von ABA festzustellen. Dies gilt sowohl für eine Aufnahme von ABA durch die Wurzeln, als auch über die Blätter direkt. Hier zeigte sich also genauso wenig ein Einfluss auf die ABA-Synthese wie auch schon in Tomate und Augenbohne (Iuchi et al., 2000; Thompson et al., 2000). Wenn die PtAO regulatorische Aufgaben besitzt, betreffen diese nicht die Feedback-Reaktionen mittels ABA.

In Arabidopsis ist eine Erhöhung der XDH1-Transkription in verschiedenen Stresssituationen zu beobachten. Auch nach ABA-Applikation war dieser Anstieg zu verzeichnen und ein damit korrelierender Aktivitätsanstieg (Hesberg et al., 2004). Da sich eine Induktion der XDH bei einer Zugabe von 100 µM ABA im Medium zeigte, scheint dies auch für Pappel zu gelten.

Abgetrennte Blätter der ABA3::GUS-Pflanzen wurden mit 100, 200 und 400 µM ABA besprüht und nach verschiedenen Inkubationszeiten hinsichtlich ihrer GUS-Expression getestet. Auch hier war keine signifikante Induktion oder Repression des ABA3-Promoters als Folge der Besprühung festzustellen. ABA-Feedbackmodulationen sind bei der Promoterregulation in Populus nicht nachweisbar.



Effekte von Salzstress auf die transgenen Pappeln.

Salzstress ist ein ernst zu nehmendes Problem in der Landwirtschaft, denn über 800 Millionen Hektar Land sind durch Salz beeinflusst, was mehr als 6% der weltweiten Landfläche entspricht (Munns and

Tester, 2008). Salz führt zu einem verminderten Wachstum und Entwicklung der Pflanzen (Huang et al., 2009). Der Begriff Salinität bedeutet einen großen Gehalt an Salzen im Allgemeinen, jedoch stellt NaCl den größten Teil des Salzgehaltes dar, so dass die meisten Schutzmechanismen mit der Regulation der Akkumulation und des Ausschlusses von NaCl zusammenhängen. Salinität verursacht ionischen und osmotischen Stress. Damit geht eine Imbalanz der Nährstoffe und oxidativer Stress einher (Türkan and Demiral, 2009). Um mit solchen Gegebenheiten zurechtzukommen, werden bestimmte Gene aktiviert. Hohe Konzentrationen von Na^+ stören das osmotische Gleichgewicht und verursachen einen „physiologischen Trockenstress“, der die Pflanze vor der Wasseraufnahme und einer weiteren Aufnahme von NaCl schützt (Türkan and Demiral, 2009). Durch osmotischen Stress kommt es zur Akkumulation von ABA (Zhu, 2002). Diese Veränderungen des ABA-Gehalts in verschiedenen Geweben konnten in vielen Pflanzenarten gefunden werden (Fricke et al., 2006; Zhu et al., 2005). Über *Populus* ist jedoch noch wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Auswirkungen von NaCl auf den ABA-Gehalt und die Aktivität der AO und XDH untersucht werden, sowie Transskriptionsanalysen des ABA3-Promoters vorgenommen werden.

Die morphologische Auswirkung einer NaCl-Applikation von 50 mM war drastisch, denn den behandelten Pflanzen war der fehlende Turgor anzusehen. Dies betraf nicht nur den Wildtyp, sondern auch alle Typen der transgenen Pappeln. Phänotypisch waren die Wildtypen und transgenen Pflanzen nicht zu unterscheiden.

Xiong et al. (2001) konnten eine Erhöhung der ABA3-Expression unter Salzstress in *Arabidopsis* nachweisen. Durch die Überexpression der Moco-Sulfurase wäre auch ein Anstieg der Aktivität der AO und XDH zu erwarten. Hinsichtlich der AO-Aktivität war keine signifikante Steigerung in den Blättern zu verzeichnen. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Pflanzenarten unter Salzstress gemacht. In Weizen war ein Aktivitätsanstieg in den Wurzeln und nicht in den Blättern festzustellen (Omarov et al., 1998). In Zdunek-Zastocka und Lips (2003b) war unter Verwendung von AB-Aldehyd eine AO-Induktion zu sehen. Des Weiteren zeigte sich eine erhöhte AO3 Aktivität in Wurzeln und Blättern bei NaCl und gleichzeitiger Applikation von NO_3^- (Zdunek-Zastocka et al., 2004).

Trotz der unveränderten Aktivität war aber eine Erhöhung der ABA-Werte zu messen. Der ABA-Gehalt steigt nach 16 h Salzstress drastisch an. Je höher die Konzentration war, desto stärker waren die gemessenen ABA-Werte. Nach weiteren 24 h sinkt aber der Gehalt auf ein niedrigeres Niveau, wobei die Werte der größeren Konzentrationen immer noch höhere ABA-Gehalte besitzen als die Kontrolle. Diese Beobachtung eines transienten Anstiegs wurde auch in Gerste beschrieben (Munns and Tester, 2008). Scheinbar ist ABA nur für eine schnelle Stressantwort nötig, nach einer gewissen Zeit stehen wahrscheinlich andere Signalwege im Vordergrund.

Auf Grund der unveränderten Aktivitäten stellt sich die Frage, woher das ABA stammt, wenn sich die Aktivitäten in den Blättern nicht erhöhen. Der Herkunftsort von ABA könnte die Wurzel sein. Die häufige Feststellung der Aktivitätserhöhung in den Wurzeln von verschiedenen Arten führt zu der Annahme, dass die Wurzel als erstes betroffenes Organ den Stress registriert, ABA daraufhin synthetisiert und über das Xylem in die Blätter transportiert wird (Zdunek-Zastocka and Lips, 2003b). Dies könnte auch bei Pappel der Fall sein. Die AO-Aktivität in den Wurzeln konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gemessen werden, denn die Proteinextraktion aus den Wurzeln stellte sich als ungenügend heraus und eine ausreichende Proteinkonzentration konnte nicht erzielt werden.

Auffällig sind die unterschiedlichen Reaktionen der transgenen Pappeln bezüglich der ABA-Werte. Der Anstieg im ABA-Gehalt des Wildtypen ist am stärksten. Obwohl die ABA3-Überexprimierer keine Reduktion in einem für die ABA-Biosynthese nötigen Enzymen besitzen, kommt es hier nur zu einem tendenziell geringeren Anstieg im Vergleich zum Wildtyp bei 16 h Salzstress. Bei einer Stressdauer von 40 h liegen die Werte des Wildtypen und der Überexprimierer nahezu im selben Bereich. Bei den knock down-Pflanzen (AO- und ABA3-RNAi-Pflanzen) kommt es zu einem dreifachen ABA-Anstieg bei 75 mM und etwas höher bei 150 mM. Diese Anstiege können nicht mit einer ABA-Produktion in den Wurzeln begründet werden, denn die AO bzw. ihr Aktivator ist in allen Zellen stark reduziert. Es stellt sich die Frage, wie diese Menge an ABA bei einer drastisch reduzierten bzw. nicht nachweisbaren AO-Aktivität produziert wird.

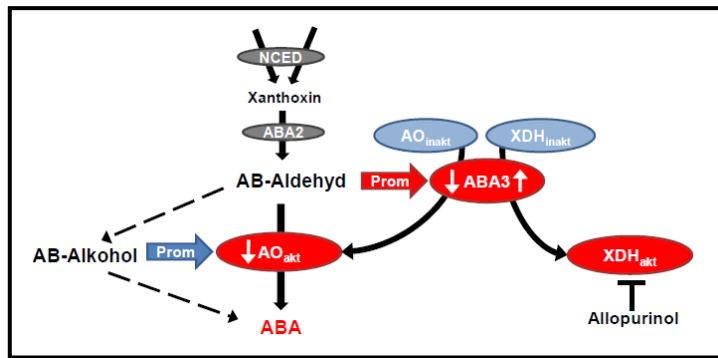
Durch den Salzstress war eine Erhöhung der XDH-Aktivität aller Pflanzen außer den ABA3 knock down-Pflanzen zu beobachten. Hier war keinerlei XDH-Aktivität erkennbar. Die Induktion der XDH war abhängig von der NaCl-Konzentration und der Dauer des Stresses. Je höher die Salzkonzentration war, desto stärker war auch die Intensität der XDH-Bande. Außerdem war die Aktivität höher, je länger der Stress andauerte. Jedoch gehört *P. x canescens* zu den salzsensitiven Arten, so dass bei einer hohen Konzentration von 150 mM NaCl und einer Dauer von 40 bzw. 66 h sich schon Proteindegradation zeigt. Aus diesem Grund sind rückläufige Aktivitäten, auch die AO betreffend, zu beobachten. Ein

Anstieg der XDH-Aktivität war auch in den nodalen Wurzeln von Mais unter NaCl- und NH_4^+ -Applikation (Barabas et al., 2000) und in Weidelgras zu beobachten (Zdunek-Zastocka and Lips, 2003b). In Erbse war unter Salzstress nur dann eine Aktivitätssteigerung zu erzielen, wenn eine gleichzeitige Ammoniumzugabe erfolgte (Zdunek-Zastocka and Lips, 2003a). Hesberg et al. (2004) beschreiben die Steigung der XDH1-Expression aus Arabidopsis unter Salzstress, jedoch war keine Aktivitätssteigerung zu verzeichnen.

Der XDH wird eine Rolle im Stickstoffmetabolismus während Stresssituationen zugesprochen. Durch Nutzen von Ureiden statt Aminen als Transportform kann eine Energieeinsparung von 6-9 ATP-Äquivalenten für jedes transportierte Stickstoffatom erzielt werden. Beim Salzstress kommt es auch zur Minderung der Photosyntheserate und so sind Energieeinsparungen nötig (Triplett et al., 1980). Obwohl es sich bei der XDH um eine strenge Dehydrogenase und keine Oxidase handelt, ist sie in der Lage Superoxidradikale zu bilden. Superoxidradikale können in der Antwort auf verschiedene Stressoren beteiligt sein. Jedoch können reaktive Sauerstoffspezies auch Zellschäden verursachen. In tierischen Geweben dient Harnsäure als effektiver Radikalfänger, um Schäden zu verringern (Zdunek-Zastocka and Lips, 2003a). Eine Aktivitätssteigerung könnte demnach als Zellschutz dienen.

Aus diesem Grund könnte auch die Populus-XDH in diesen Prozessen, wie der Stickstofftranslokation, der Stressantwort und dem Zellschutz, beteiligt sein, so dass es zur Erhöhung der Aktivität kommt.

In Xiong et al. (2001) wurde eine Expressionssteigerung von ABA3 unter Salzstress beobachtet. Anhand von Promoterstudien sollte dies auch für Pappel überprüft werden. Der ABA3-Promoter wurde dazu mit dem Reportergen GUS fusioniert. Es sind keinerlei Steigerungen der GUS-Aktivität nach 1, 5 bzw. 24 h der NaCl-Applikation festzustellen. Erst nach 120 h sind erhöhte GUS-Werte zu messen, die auf eine erhöhte Transkriptionsrate von ABA3 hinweisen. Dieses Ergebnis ist konträr zu der Steigung der ABA-Gehalte. Diese steigen in einer schnellen, transienten Stressantwort an, sinken aber dann wieder auf ein niedriges Niveau. ABA3 induziert jedoch nicht alleinig die AO, sondern auch die XDH. Möglicherweise wird eine erhöhte XDH-Aktivität für die Stressantwort benötigt, so dass es zur vermehrten ABA3-Expression kommt. Dies ist jedoch rein spekulativ. Eine unterschiedliche Regulation von AO und XDH erscheint dennoch wahrscheinlich, da trotz unveränderter AO-Aktivität eine Erhöhung der XDH-Aktivität zu beobachten ist.



Effekte von Trockenstress auf die transgenen Pappeln.

Trockenstress ist einer der größten Limitierungsfaktoren des Pflanzenwachstums in trockenen und halbtrockenen Regionen. Zahlreiche physiologische und biochemische Mechanismen sind für die An-

passung an die Trockenheit nötig (Lei et al., 2007). Bei Trockenstress kommt es zu einem Wasserverlust und einem Sinken des Turgors. ABA spielt bei der Aufrechterhaltung der osmotischen Homöostase eine entscheidende Rolle. Trockenstress löst die ABA-Produktion aus, welches dann andererseits verschiedene Stressgene und das Schließen der Stomata induziert (Ikegami et al., 2009; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Demnach spielt ABA eine entscheidende Rolle bei der Trockenstressantwort, da endogenes ABA stark ansteigt (Ikegami et al., 2009). Aus diesem Grund sollte auch für *Populus* die Regulation im letzten Biosyntheseschritt untersucht werden.

Alle Trockenstressergebnisse aus Pappel stammen von abgetrennten Blättern, so dass Veränderungen durch den Trockenstress im Vergleich zur Kontrolle nur auf Vorgänge im Blatt und nicht auf Transportvorgänge aus der Wurzeln zurückzuführen sind. Für *Phaseolus vulgaris* L. deuten Ergebnisse darauf hin, dass die ABA-Akkumulation in welken Blättern eher in einer Induktion der Biosynthese begründet ist als in einer Freisetzung aus dem konjugierten Katabolit oder in einer Hemmung des Abbaus (Pierce and Raschke, 1981). Die abgetrennten Blätter wurden in der vorliegenden Arbeit langsam über einen Zeitraum von 8 bis 22 h getrocknet. Der Wasserverlust über die Zeit verlief in den Wildtypen, AO-RNAi-, ABA3-RNAi- und den GFP/ABA3-Pflanzen gleichmäßig. Es waren zwar manchmal schnellere Austrocknungen bei einzelnen Pflanzen zu beobachten, jedoch lässt sich aus zahlreichen Diagrammen keine Tendenz eines schnelleren Verlustes bestimmter Pflanzentypen ableiten. Bei Trockenstressexperimenten in *A. thaliana* Wildtypen und einer ABA3-Mutante (*los5-1*) war ein deutlich schnelleres Austrocknen der ABA3-Mutante zu beobachten (Xiong et al., 2001). Dies weist auf einen Defekt im Schließen der Stomata hin. Durch die externe Zugabe von ABA konnte der Wasserverlust in der ABA3-Mutante verlangsamt werden. Im Wildtyp war dieser Effekt sehr gering, da scheinbar genügend endogenes ABA für den Stomataschluss gebildet werden konnte. Auch Pappelpflanzen, deren *aba3*-Transkript reduziert ist, wurden getestet, aber solch ein starker Effekt ist nicht zu beobachten. Die in der ABA-Biosynthese gehemmten Pflanzen (AO und ABA3 knock downs) zeigen keinen schnelleren Wasserverlust als der Wildtyp wie dies in Arabidopsis gezeigt wurde. Es wäre denkbar gewesen, dass die ABA3-Überexprimierer die langsamste Austrocknung zeigen, da sie möglicherweise zu einer

erhöhten ABA-Produktion fähig sind. In Arabidopsis unterschied sich die Trocknungsgeschwindigkeit zwischen unbehandeltem und mit 100 μ M ABA versetzten Wildtyp jedoch so gering (Xiong et al., 2001), dass sich wahrscheinlich auch bei Pappel unter erhöhtem endogenen ABA-Gehalt kein Phänotyp zeigen würde.

In getrockneten Proben des Wildtyps und der AO-RNAi-Pflanzen war das *ptao2*-Transkript drastisch reduziert. Auch wenn die PtAO2 möglicherweise keinen Hauptregulationspunkt der ABA-Biosynthese darstellt und auf Grund dessen eine geringere Bedeutung für die Trockenstressantwort hat, erscheint die Reduktion unter Trockenstress sehr unwahrscheinlich. Durch den hohen Anteil an sekundären Pflanzenstoffen in Populus ist eine RNA-Isolation schwierig. Unter Trockenstress war diese RNA-Isolation möglicherweise qualitativ nicht ausreichend für eine RT-PCR. Jedoch wäre für eine eindeutige Aussage über eine Reduktion entweder ein interner Standard oder eine real time PCR nötig.

Durch den erhöhten ABA-Bedarf während Trockenstress kommt es zu Induktion der Synthese. Für Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass die NCED3 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Iuchi et al., 2001; Tan et al., 2003). Aber auch die AO scheint eine Rolle zu spielen, denn die Expression der AAO3 und von ABA3 steigt in getrockneten Blättern in *A. thaliana* rasch an (Seo et al., 2000a; Xiong et al., 2001). Demnach wäre auch eine erhöhte AO-Aktivität zu erwarten. Jedoch sind hier die Ergebnisse konträr. Während Seo et al. (2000a) keine Veränderung der Aktivität verzeichnen konnten, zeigten Bittner et al. (2001) einen Anstieg der AO-Aktivität unter Trockenstress. Dies galt es für Populus zu überprüfen.

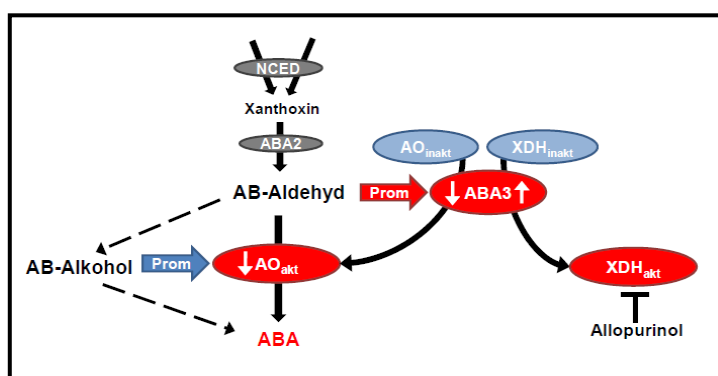
In den getrockneten Pappel-Blättern war kein signifikanter Anstieg der AO-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Bei den AO knock downs konnte zwar teilweise eine schwache Färbung erreicht werden, aber in den ABA3-RNAi-Pflanzen war keinerlei AO-Aktivität nachzuweisen. Jedoch kam es zu einem drastischen Anstieg der ABA-Gehalte durch die Trocknung. Bei einer Reduktion des Frischgewichts von 20% lagen die ABA-Werte des Wildtyps, der AO-RNAi-, ABA3-RNAi und GFP/ABA3-Pflanzen im selben Bereich. Bei einem Verlust von 40% ist insgesamt ein höherer ABA-Anstieg zu verzeichnen. Die Gehalte aller Transformanten und des Wildtyps sind nahezu identisch bis auf die ABA3 knock downs, deren Werte etwas niedriger liegen. In Arabidopsis ergab ein 30%iger Frischgewichtsverlust einen 4,1 fachen ABA-Anstieg des Wildtyps und eine 1,8 fache Erhöhung der ABA3-Mutante (Xiong et al., 2001). Der ABA-Gehalt war in den Mutanten demnach unter Trockenstress um ungefähr die Hälfte reduziert, während im unbehandelten Zustand keine Unterschiede festzustellen waren. In Populus sind deutlich stärkere ABA-Anstiege zu verzeichnen, jedoch ist hier kein Phänotyp in Form eines drastisch reduzierten Gehaltes zu beobachten. An dieser Stelle stellt sich erneut die Frage der Herkunft von ABA. Die Translokation über die Wurzeln ist nicht möglich, da es sich um abgetrennte Blätter handelt. Allerdings ist diese

häufig diskutierte ABA-Synthese in den Wurzeln und anschließender Transport in die Blätter bei Trockenstress auf Grund neuester Erkenntnisse zweifelhaft anzusehen (Ikegami et al., 2009). In *Arabidopsis* kommt es bei Trockenstress zu einem erhöhten ABA-Level in den Blättern und Wurzeln. Wenn aber die Blätter und Wurzeln getrennt voneinander dem Trockenstress ausgesetzt werden, kommt es nur in den Blättern zu einem ABA-Anstieg. Es konnte gezeigt werden, dass ABA hauptsächlich in den Blättern produziert wird und dann ein Transport in die Wurzeln erfolgt. Dieser Transport wird durch das Wasserdefizit in den Wurzeln aktiviert (Ikegami et al., 2009).

Obwohl die AO keinerlei Induktion unter Trockenstress zeigt, ist teilweise eine stärkere Färbung der XDH zu beobachten. Dies gilt für alle Transformanten und den Wildtyp bis auf die ABA3-RNAi, die keinerlei Aktivität aufweisen. In *A. thaliana* wird in Folge eines Trockenstress das XDH1-Transkript akkumuliert und es steigt die Aktivität. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine Begleiterscheinung der Induktion der ABA-Biosynthese handelt und es so nur eine indirekte Verbindung zum Trockenstress gibt (Hesberg et al., 2004). Dieser Umstand könnte auch für Pappel gelten, jedoch müsste dies mit Transkriptamplifikationen unter Trockenstress und ABA-Behandlung im Vergleich analysiert werden.

Ergänzend sind Promoterstudien zur Induktion des ABA3-Promoters durch Trockenstress durchgeführt worden. In mehreren Variationen der Versuchsbedingungen war keine Induktion des Promoters durch den Trockenstress erkennbar.

Gleichzeitig durchgeführte histochemische Färbungen indizierten eine erhöhte Promoterinduktion in der Blattnervatur. Aus diesem Grund wurde nur die GUS-Aktivität in der Nervatur vermessen. Insgesamt konnten höhere GUS-Werte erhalten werden, so dass mögliche geringe Änderungen leichter erkannt werden können. Jedoch war auch mit diesem Ansatz keine Induktion durch Trockenstress zu erkennen, denn es wurden geringere GUS-Aktivitäten gemessen. In Stresssituationen wird die Expression von nicht dringend benötigten Genen reduziert. Dies weist auf eine geringere Bedeutung von ABA3 im Trockenstress hin.



Organspezifische Expression von ABA3.

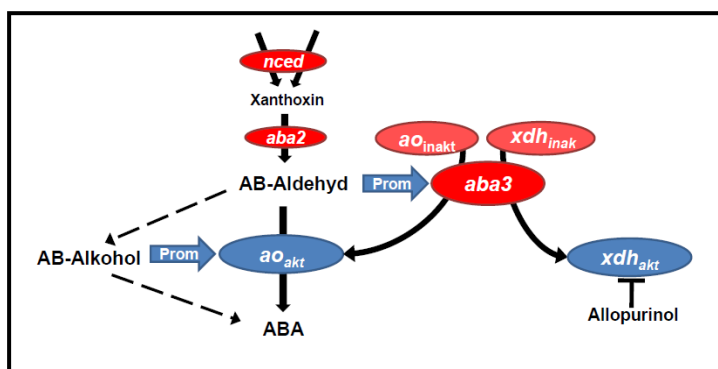
Ergänzend zu der Frage nach der regulatorischen Bedeutung der AO und ihres Aktivators ABA3 sollte geklärt werden, ob auch eine organspezifische Regulation vorliegt. Mit Hilfe des ABA3-Promoter-Kon-

struktes wurde untersucht, ob ABA3 organspezifisch exprimiert wird. In histochemischen GUS-Färbungen gab es Hinweise für erhöhte Expression in der Blattnervatur und auch fluorimetrische Messungen erzielten höhere Werte in der Nervatur im Vergleich zum ganzen Blatt. Auf Grund dieses Indizes der organspezifischen Expression wurden die AO- und XDH-Aktivitäten in der Nervatur im Vergleich zum gesamten Blatt überprüft. Dabei war tatsächlich eine stärkere Färbeintensität der AO und XDH in der Blattnervatur zu beobachten. Auch in der Nervatur war die AO in den AO-RNAi und ABA3-RNAi-Pflanzen nicht nachweisbar und es zeigte sich keine XDH-Aktivität in den ABA3 knock downs.

Trotz der höheren AO-Aktivität in der Nervatur war der ABA-Gehalt dort im Vergleich zum gesamten Blatt nicht gesteigert. Des Weiteren war auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Transformanten und dem Wildtyp zu erkennen.

Die AAO3 betreffend konnte in Arabidopsis gezeigt werden, dass sie in den vaskulären Geweben exprimiert wird. Dies gilt besonders in den phloembenachbarten Zellen und dem Xylemparenchym neben den Siebzellen und Xylemgefäßen, sowie den Blattadern und Stamm. Phloem und Xylem haben eine entscheidende Rolle beim Transport von gelösten Substanzen und Makromolekülen. Diese wichtige Funktion und die vaskuläre Lokalisation der ABA-Biosynthese-Enzyme führen zu der These, dass osmotische Stresse in den vaskulären Geweben überwacht werden und die ABA-Synthese von den benachbarten Zellen oder dem Xylemparenchym reguliert wird. ABA wird dann in die Gewebe oder Organe, wo es benötigt wird, durch die Siebzellen oder die Xylemgefäße transportiert (Koiwai et al., 2004).

Eine erhöhte PtAO-Aktivität in der Nervatur korreliert mit den in Arabidopsis gemachten Beobachtungen. Auch in Pappel könnte bei gesteigerter AO-Aktivität eine erhöhte ABA-Syntheserate in den vaskulären Geweben zu finden sein. Ein Transport in andere Gewebe und Organe würde für den gleichbleibenden ABA-Gehalt in der Nervatur trotz stärkerer Aktivitätsfärbungen im Vergleich zum ganzen Blatt sprechen. Für eine erhöhte AO-Aktivität ist auch eine verstärkte Expression der ABA3 nötig, was eine Erklärung für die erhöhten GUS-Werte des ABA3-Promoter-Konstruktes in der Nervatur wäre.



Microarray-Analysen.

Salz- und Trockenstress führen zwar zu keiner signifikanten Veränderung der AO-Aktivität, jedoch steigt der ABA-Gehalt drastisch an. Dies gilt für den Wildtyp, die AO-RNAi-, ABA3-RNAi- und GFP/ABA3-Pflanzen. Da sich durch die

genetischen Modulationen im letzten Schritt der ABA-Biosynthese keine signifikanten Unterschiede bei der ABA-vermittelten Stressantwort zeigten, sollte mit Hilfe von Transkript-Analysen untersucht werden, welche Schritte eine regulatorische Rolle in Pappel spielen. Im Microarray wurden deshalb ein Wildtyp und die ABA3-RNAi Nr. 4 jeweils unbehandelt und im Trockenstress im einfachen Ansatz untersucht.

In Folge des Trockenstress kommt es besonders in der ABA3-RNAi zu einer erhöhten NCED-Expression. Da in den ABA3 knock down-Pflanzen auf Grund der reduzierten AO-Aktivität eine Verminderung der ABA-Produktion erwartet wird, könnte durch eine Steigerung der NCED die Substratmenge der AO ebenfalls erhöht werden, so dass mehr ABA produziert wird. Dies würde für eine entscheidende Rolle der NCED in der ABA-Biosyntheseregulation in *Populus* sprechen. Eine andere Möglichkeit die ABA-Produktion zu erhöhen, wäre die ABA-Synthese über den in Tomate beschriebenen Shunt-Pathway (Rock et al., 1991). Hierbei erfolgt die AB-Aldehydoxidation zu ABA über das Intermediat AB-Alkohol. Die Oxidation des AB-Alkohols geschieht über eine P450-Cytochrom-Monooxygenase. In Folge des Trockenstress kommt es zur Expressionserhöhung dieses Enzyms sowohl im Wildtyp als auch in der ABA3-RNAi-Pflanze im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dies würde für eine Hochregulierung des Shunt-Pathways zur Stressadaption sprechen. Jedoch übernimmt die P450-Cytochrom-Monooxygenase auch wichtige Rollen bei weiteren zellulären Prozessen, wie auch im ABA-Katabolismus. Da die ABA3-RNAi-Pflanze einen Mangel in der ABA-Biosynthese besitzt, wäre hier eine größere Expressionssteigerung der P450-Cytochrom-Monooxygenase zu erwarten gewesen, um die AO-Defizienz auszugleichen. Dies zeigt sich im direkten Vergleich der getrockneten Proben untereinander. Im Vergleich der getrockneten Wildtypen und der ABA3-RNAi-Pflanze mit den Kontrollen ist dieses Enzym im Wildtyp stärker exprimiert als in der ABA3-RNAi, was genau gegensätzlich erwartet wurde. Aus diesem Grund kann die gesteigerte Expression nur ein Indiz für den Shunt Pathway darstellen.

Allerdings konnte auch eine Reduzierung des P450-Cytochrom-Monooxygenase vor allem beim Vergleich der ABA3-RNAi und dem Wildtyp im gestressten Zustand beobachtet werden. ABA kann auf verschiedenen Wegen abgebaut werden. Der häufigste Inaktivierungsweg ist die 8'-Hydroxylierung und wird durch eine P450-Cytochrom-Monooxygenase katalysiert (Nambara and Marion-Poll, 2005). Eine Reduzierung des Abbaus erscheint also besonders in der ABA3 knock down-Pflanze sinnvoll und erklärt die Herunterregulierung der P450-Cytochrom-Monooxygenase. Verschiedene P450-Cytochrom-Monooxygenase sind auf Grund der unterschiedlichen Funktionen wahrscheinlich.

Auch Komponenten der ABA-vermittelten Signaltransduktion wurden durch den Trockenstress beeinflusst. Die Mg^{2+} - und Mn^{2+} -abhängigen Serin-Threonin-Phosphatasen vom Typ 2C (PP2C) sind an der Weiterleitung von ABA-Signalen beteiligt. In *Arabidopsis* konnten

zwei verschiedenen PP2Cs gefunden werden: ABI1 und ABI2. Die PP2C unterdrücken die ABA-vermittelte Antwort bei der Signaltransduktion (Ma et al., 2009). Im Trockenstress wäre demnach eine Reprimierung der PP2Cs und eine verstärkte Expression ihres Antagonisten RCAR1 (Regulator Component of ABA Receptor 1) zu erwarten, um die ABA-Signalweiterleitung nicht zu stören. Jedoch zeigt sich eine Expressionssteigerung der PP2Cs und keine Veränderung des RCAR1. Dieses Verhalten erscheint unwahrscheinlich und ist möglicherweise durch die fehlenden Replikate des Microarrays zu erklären.

Inositol-Triphosphat gehört ebenfalls zu den sekundären Messenger (Popko et al., in press), jedoch waren keine Transkripterhöhungen der Enzyme in Folge des Trockenstress festzustellen, die an der Inositol-Triphosphat-Synthese beteiligt sind. Durch eine Kaskade der MAP-Kinase (MAPK) kommt es zur Weiterleitung der Stresssignale, was zu einer Regulation des Stomataöffnungsgrades und der Kontrolle des Wasserstatus der Zelle führt. Auf Grund der wichtigen Rolle der MAPK an der ABA-vermittelten Stressantwort ist auch die beobachtete Reduzierung dieses Enzyms unwahrscheinlich.

Auffällig ist auch die Reduzierung der Expression von Calmodulin und einer Peroxidase im Trockenstress der Transformanten im Vergleich zur Kontrolle (4_80_4_K) und zum gestressten Wildtyp verringert (4_80_WT_80). Es konnte ein Zusammenhang zwischen Calciumionen, Calmodulin, Wasserstoffperoxid und der ABA vermittelten Stressantwort gezeigt werden (Hu et al., 2006). Calcium-Calmodulin (Ca^{2+} -CaM) ist als wichtiger Ca^{2+} -Ionen Rezeptor an der ABA-induzierten Bildung von Antioxidantien beteiligt. Durch Trockenstress und den damit verbundenden ABA-Anstieg kommt es zur Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration, welche einen wichtigen second Messenger darstellen (Bowler and Fluhr, 2000). Auch Wasserstoffperoxid soll bei der Ca^{2+} -CaM Signaltransduktion eine Rolle spielen. Desikan et al. (2001) konnten eine Erhöhung der Calmodulin-Expression durch eine gesteigerte H_2O_2 -Konzentration zeigen. Durch exogene Zugabe von Calmodulin kam es zur Schließung von Spaltöffnungen (Chen and Gallie, 2004). Eine Verminderung der Calmodulinexpression in *Populus* wäre also gegenläufig zu den bisher veröffentlichten Daten und müsste in einer Wiederholung reproduziert werden. Eine Reduzierung einer Peroxidase, die Wasserstoffperoxid abbaut, ist jedoch sinnvoll, weil es dadurch zur Calmodulinexpression kommt. Jedoch ist zu beachten, dass es sich bei dem herunterregulierten Gen nicht um das tatsächliche Calmodulin, sondern um ein Calmodulin-ähnliches Protein handelt. Calmodulin in seiner eigentlichen Form ist auch bei den hochregulierten Genen zu finden.

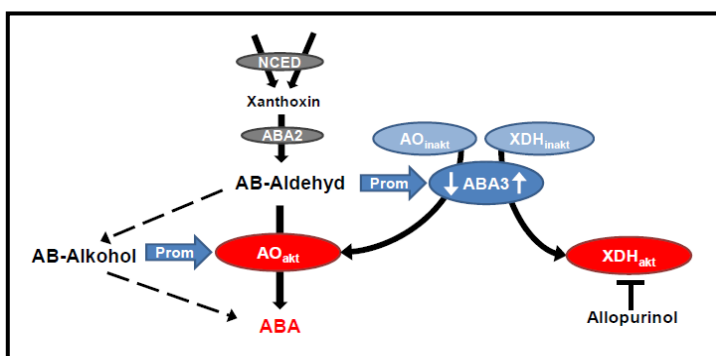
Die zu erwartenden Transkriptomveränderungen waren nicht nachzuweisen bzw. gegenläufig. Auf Grund der fehlenden statistischen Parameter durch den einfachen Datensatz können diesbezüglich keine eindeutigen Ergebnisse gewonnen werden.

Auffällig ist die Expressionssteigerung einzelner Komponenten des Photosystems bei einem Vergleich der getrockneten ABA3-RNAi-Pflanze und des Wildtyps. Bei der Photosynthese

wird die Lichtenergie durch Adsorptionskomplexe genutzt und in Form von Elektronen an Reaktionszentren der Photosysteme weitergeleitet. Die Elektronen werden schließlich an einen finalen Elektronenakzeptor übertragen. In Zeiten von starker Bestrahlung wird Sauerstoff als Akzeptor verwendet, wodurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Die Chloroplasten und damit das Photosystem stellen eine wichtige ROS-Quelle dar. ROS wird eine Rolle bei der ABA-vermittelten Antwort durch ihren Einfluss auf Ca^{2+} -Ionen Kanäle zu geschrieben (Dat et al., 2000; Popko et al., in press). Die Erhöhung der ROS könnte also als Teil der Adaption der ABA3 knockdown-Pflanzen an geringere ABA-Mengen gewertet werden. Jedoch ist zu erwarten, dass die ABA3-RNAi-Pflanzen durch Reduktion der AO stressempfindlicher sind als der Wildtyp, was zu einer deutlich stärkeren Reaktion auf den Stress führen könnte. Andere ROS-produzierende Enzyme konnten in keinem Vergleich im Microarray nicht nachgewiesen werden.

Bei Trockenstress muss die osmotische Homöostase aufrechterhalten werden. Prolin stellt dabei ein wichtiges Osmolyt dar (Samuel et al., 2000). Die Hochregulierung von prolinreichen Proteinen konnte gezeigt werden.

3.4 Saisonaler Verlauf der ABA-Biosynthese adulter Pappeln



Ein wichtiger Aspekt, der Pappel als zweiten Modellorganismus für Pflanzen neben Arabidopsis sinnvoll macht, ist das mehrjährige Wachstum, wodurch saisonale Effekte Einfluss auf das Wachstum haben (Jansson and Douglas, 2007).

Neben der Beteiligung von ABA bei der Antwort auf verschiedene Stresse ist es auch in Entwicklungsprozessen wie Knospen- und Samenruhe, Wachstumsregulation, Blattseneszenz und – abwurf, sowie Stomataöffnung beteiligt. Laubbäume zeigen einen immer wiederkehrenden Jahresverlauf: Brechen der Knospenruhe, Blattwachstum und – entwicklung (Fedoroff, 2002). Bei diesen Prozessen spielt ABA eine wichtige Rolle. Am Jahresende, wenn die Tage kürzer werden, kommt es zur beginnenden Seneszenz und nachfolgendem Abwurf der Blätter. Es konnte gezeigt werden, dass die Gene der ABA-Biosynthese nach drei bis vier Wochen nach dem Beginn von kurzen Tagen (weniger als 12 h Licht) induziert werden, was einen transienten ABA-Anstieg verursacht (Ruttink et al., 2007). Auf Grund dieser Erkenntnisse sind zwei ABA-Maxima während des Jahres zu erwarten, nämlich zur

Winterzeit, Knospendormanz und im Sommer als Trockenstressantwort. Um diesen Jahresverlauf zu überprüfen, wurden wöchentlich Proben von zwei Pappeln genommen, die im Botanischen Garten Braunschweig stehen: *P. x canadensis* und *P. deltoides* (ungefähr 40 Jahre alt). Die ABA-Gehalte in den Blattknospen beider Arten sinken im fortschreitenden Jahr. Zu diesem Zeitpunkt wird die Knospenruhe gebrochen und es kommt zur Entwicklung der Blätter. Da ABA die Knospendormanz verursacht, muss sich der Gehalt verringern, damit es zur Entwicklung der Blätter kommt.

Sowohl in der Rinde als auch in den Blättern ist im Sommer ein ABA-Maximum zu finden. Im restlichen Jahr scheint die Rinde normalen Schwankungen zu unterliegen. In den jungen, sich entwickelnden Blättern gibt es einen weiteren Anstieg von ABA, der sich schnell wieder verringert. In Folge des sinkenden ABA-Gehalts am Jahresanfang wird die Knospendormanz gebrochen. Dies könnte der Grund für die am Anfang höheren ABA-Werte sein.

Das ABA-Maximum im Sommer scheint in erster Linie bei der Trockenstressantwort im Spross eine Rolle zu spielen. Jedoch besitzt es auch Einflüsse auf die Wurzeln. Es reguliert das Wurzelwachstum, die Morphologie und die Symbiose mit Mykorrhiza. Für Tomatenpflanzen, die einen Defekt in der ABA-Synthese besitzen, konnte gezeigt werden, dass auch die Bildung der Symbiose eingeschränkt war (Herrera-Medina et al., 2007). Die Mykorrhiza liefern der Pflanze Nährsalze und Wasser. Gerade bei osmotischem Stress, wie Trockenstress, erscheint also so eine Symbiose sinnvoll, denn sie unterstützt die Stressadaption. Andererseits verursacht eine Flutung der Wurzeln, wie sie häufig bei an Ufern wachsenden Pflanzen auftritt, keinen ABA-Anstieg in Pappelblättern (Liu and Dickmann, 1992).

Zusätzlich zu der Messung der ABA-Gehalte wurden auch die Aktivitäten von AO und XDH bestimmt. Diese waren aber nur für die Art *P. x canadensis* möglich, da nur hier die Extrakt Herstellung mit einer ausreichend hohen Proteinkonzentration gelang. Für einen Überblick wurden Blattproben in einem ungefähren Abstand von vier Wochen gewählt.

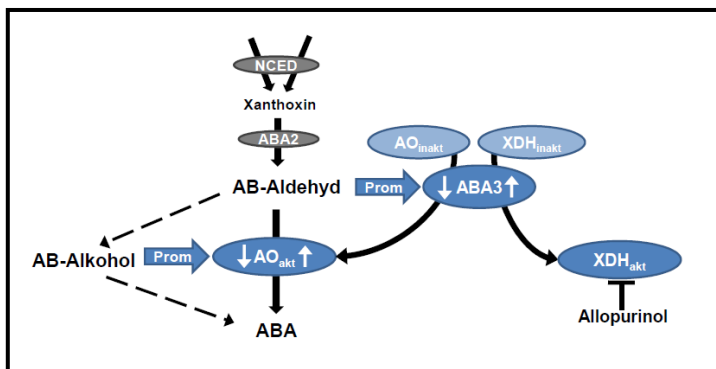
Bisherige PtAO-Färbungen an *P. x canadensis* zeigten lediglich eine Bande, die sich auf der Höhe der obersten Arabidopsis Bande befand. Bei *P. x canadensis* war aber nur ein Schatten dieser obersten Bande zu erkennen, deren Stärke im Jahresverlauf weiter abnimmt. Allerdings konnte eine zweite Bande angefärbt werden, die sich auf Höhe der untersten Arabidopsis Bande befindet, deren Intensität im Jahresverlauf stärker wird. Die AO-Aktivität zeigt keine direkte Verbindung zu den ABA-Maxima, da sonst eine stärkere Bande am Jahresanfang und im Sommer zu beobachten sein müsste.

In den jungen, sich entwickelnden Blättern ist die XDH-Aktivität stärker und nimmt dann im Laufe des Jahres ab. Wie bereits oben beschrieben wird der XDH eine Rolle im Stickstoffmetabolismus in Stresssituationen zu gesprochen. Gerade in jungen Blättern wird viel Energie für die Blattentwicklung benötigt. Durch Nutzen von Ureiden statt Aminen als Trans-

portform kann Energie gespart werden (Triplett et al., 1980). Dies könnte die Induktion der XDH begründen.

Jedoch ist auch bei der XDH-Färbung eine zweite Bande zu beobachten, deren Stärke zunimmt. Im Rahmen dieser Arbeit kann nicht geklärt werden, inwieweit es sich bei den zusätzlichen Banden beider Enzymfärbungen um jeweils eine zweite spezifische Färbung handelt. Da die zusätzlichen Banden auf ungefähr derselben Höhe laufen, könnte es sich auch um ein Enzym handeln, dass unter Verwendung von sowohl Indol-3-carboxaldehyd als auch Xanthin und Hypoxanthin eine Färbung verursacht.

3.5 Ausblick



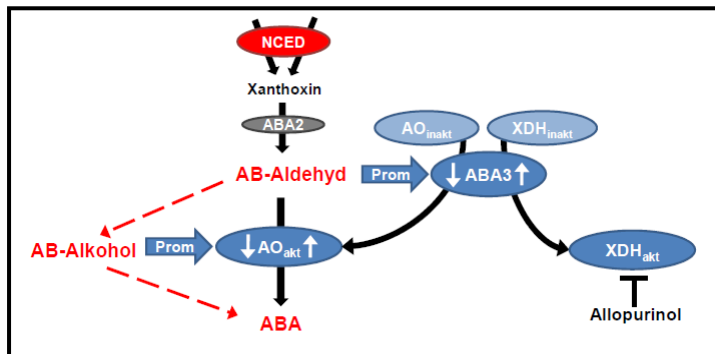
In der genetischen Modulation konnten in Pappel einige Beobachtungen gemacht werden, die sich von denen in Arabidopsis unterschieden.

Arabidopsis KO-Mutanten, die einen Defekt in ABA3 besitzen, zeigen einen welken Phänotyp,

wohingegen sich die Pappel AO und ABA3 knock down-Pflanzen morphologisch nicht vom Wildtyp unterscheiden. Die AO-RNAi-Pflanzen besitzen nur eine sehr schwache AO-Aktivität, während die XDH unverändert ist. Bei den ABA3 knock downs sind beide Enzyme nicht nachzuweisen. ABA3- und AAO3-Überexprimierer unterscheiden sich weder im Phänotyp noch in den Enzymaktivitäten vom Wildtyp.

Im unbehandelten Zustand liegen die ABA-Gehalte von den Transformanten und dem Wildtyp sowohl in Arabidopsis als auch in Populus im gleichen Bereich. Auch Xiong und Zhu (2003) berichten von einem nahezu unveränderten ABA-Gehalt im ungestressten Zustand. Erst im gestressten Zustand sind teilweise Unterschiede zum Wildtyp und zu den ABA3 Überexprimierern zu beobachten. Unter Salzstress kommt es zu einem geringeren Anstieg im ABA-Gehalt der knock down-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp und den Überexprimierern. Im Trockenstress, in dessen Folge die Erhöhungen drastischer sind, sind diese Unterschiede nicht vorhanden. Bei Arabidopsis hingegen betragen die Werte der ABA3-Mutanten im Trockenstress ungefähr die Hälfte vom Wildtyp. Hier ist ein deutlicher Effekt in der ABA-Biosynthese erkennbar. Jedoch wird die Frage der AO-Aktivitätserhöhung in Arabidopsis kontrovers diskutiert. In Pappel ist hingegen keine Aktivitätserhöhung in Folge eines Stresses zu beobachten. Außerdem sind keine Induktionen des ABA3-Promoters zu beobachten, die mit dem ABA-Anstieg korrelieren.

An dieser Stelle stellt sich die Frage der Herkunft des ABAs. Für AO-RNAi-Pflanzen besteht die Möglichkeit der Funktionsübernahme durch eine andere AO bzw. die XDH. Da es aber bei einer Induktion der XDH zu keiner vermehrten ABA-Synthese kommt, ist dies sehr unwahrscheinlich. In ABA3 knock down-Pflanzen bestehen diese Möglichkeiten jedoch nicht, weil von einer ABA3-Reduktion alle AO-Isoformen und die XDH betroffen sind. Die ABA3-RNAi- und die AO-RNAi-Pflanzen verhalten sich jedoch identisch, so dass ABA in beiden Transformanten auf gleichem Weg synthetisiert zu werden scheint.



Es können zwei Theorien aufgestellt werden. Für Arabidopsis ist es erwiesen, dass die NCED3 den Schlüsselschritt in der Regulation darstellt. Dies könnte auch für Pappel gelten, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden kann. Möglicherweise sind

schon geringste AO-Aktivitäten ausreichend, um solch große Mengen an ABA zu produzieren, so dass die Regulation vor allem durch NCED geschieht.

Eine andere Möglichkeit ist die Synthese über einen alternativen Pathway, der für Tomate beschrieben ist (Cutler and Krochko, 1999; Rock et al., 1991). Hier wird die AO umgangen, indem AB-Aldehyd zu AB-Alkohol reduziert wird und dann über eine Cytochrom P450-Monooxygenase zu ABA unter Sauerstoffverbrauch oxidiert wird (Abb. 71).

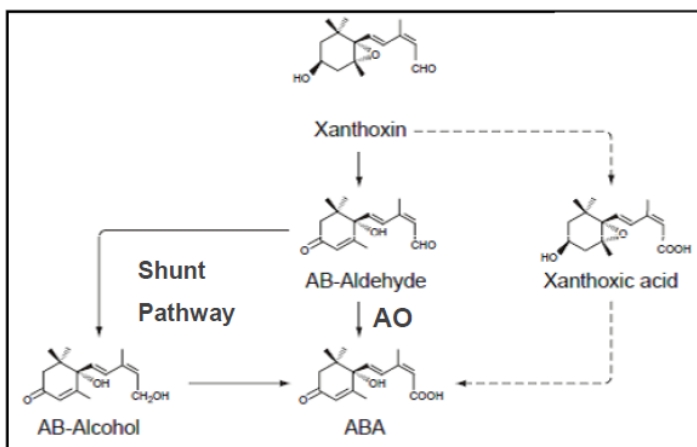


Abb. 71: Schema des letzten Biosyntheseschrittes durch die AO und den Shunt Pathway. (Cutler and Krochko, 1999)

Unter Umständen ist dieser alternative Weg in Pappel von größerer Bedeutung, so dass die Pappeltransformanten mit stark reduzierter AO trotzdem zu einem starken ABA-Anstieg fähig sind. Zur Überprüfung dieser Theorie wäre eine Analyse der Intermediate AB-Aldehyd und AB-Alkohol, sowie von ABA nötig. Wenn dieser Pathway in Pappel eine wichtigere Rolle als in Arabidopsis spielt, ist eventuell der Gehalt von AB-Alkohol in Pappel höher als in Arabidopsis.

Wenn ABA auf einem anderen Weg synthetisiert wird, ist dies möglicherweise durch eine starke Expressionserhöhung unter Stressbedingungen erkennbar. Aus diesem Grund sollte das Transkript von einem Wildtyp sowie der ABA3-RNAi Nr. 4 im Trockenstress mit dem ungestressten Zustand verglichen werden, um mögliche Einflüsse des Shunt-Pathways zu erkennen. Jedoch waren die Ergebnisse auch hier nicht eindeutig, so dass eine Untersuchung der Intermediate, AB-Aldehyd, AB-Alkohol und ABA möglicherweise Aufschluss über die Bedeutung des Shunt-Pathways in *Populus* geben.

In allen Stressexperimenten der Wildtypen und auch der transgenen Pappeln ist jedoch eine weitere Beobachtung zu machen. Obwohl nie eine signifikante Änderung der AO-Aktivität durch Stress zu erkennen ist, zeigt sich teilweise eine Intensivierung der XDH-Bande. Da sowohl die AO als auch die XDH durch ABA3 aktiviert werden, muss hier ein Unterschied in der Regulation vorliegen. Möglicherweise wird unter bestimmten Bedingungen vorrangig die XDH aktiviert. Dieser Umstand ist jedoch für *Arabidopsis* nicht beschrieben.

4.0 Zusammenfassung

Pflanzen sind weltweit abiotischen Stressen ausgesetzt, die Einfluss auf das Wachstum und die Ernteerträge ausüben. Trockenheit und Salinität beeinflussen ungefähr 10% der für Anbau geeigneten Landfläche. Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) spielt eine entscheidende Rolle bei der Stressantwort. Die Regulation der ABA-Biosynthese ist bisher hauptsächlich in *A. thaliana* untersucht worden, im Modellorganismus für Bäume - der Pappel - ist bisher kaum etwas bekannt. Neben der NCED3 wird dem Molybdoenzym Aldehydoxidase (AO) eine wesentliche Rolle bei der Regulation zugesprochen. Die Untersuchung der Regulation der ABA-Synthese durch die AO steht im Fokus der vorliegenden Arbeit.

Saisonale Untersuchungen zum ABA-Gehalt in adulten Pappeln zeigten zwei ABA-Maxima in den Blättern. Das erste in den jungen, sich entwickelnden Blättern und das zweite im Sommer. Die AO-Aktivität nimmt im Laufe des Jahres immer mehr ab, so dass keine Korrelation festgestellt werden kann. ABA unterliegt in der Rinde normalen Schwankungen. Analog zu Ergebnissen in Arabidopsis konnte eine erhöhte AO-Aktivität in der Blattnervatur von *P. x canescens* beobachtet werden, jedoch war der ABA-Gehalt im Vergleich zum gesamten Blatt unverändert.

Für folgende Untersuchungen wurden erstmalig transgene *P. x canescens*-Pflanzen erzeugt, die eine genetische Modulation im letzten Schritt der ABA-Biosynthese besitzen. Es konnten für die AO und ihren Aktivator ABA3 jeweils knock down-Pflanzen mittels RNAi und Überexprimierer erzeugt werden, sowie ein ABA3-Promoterkonstrukt, das GUS als Reportergen enthält, transformiert und regeneriert werden. Da sich die AO-Überexprimierer und das AO-Promoterkonstrukt noch in der Transformation bzw. Analyse befinden, standen diese für nachfolgende Stressexperimente nicht zur Verfügung.

Die knock down-Pflanzen und Überexprimierer zeigten morphologisch keine Unterschiede zum Wildtyp. Die AO-Aktivität war in beiden Typen von RNAi-Pflanzen drastisch reduziert, die XDH-Aktivität zusätzlich in den ABA3-RNAi-Linien. Im unbehandelten Zustand war keine Auswirkung auf den ABA-Gehalt der Transformanten zu beobachten. Obwohl sich die AO-Aktivitäten in den Salz- und Trockenstressexperimenten nicht signifikant veränderten, war ein drastischer Anstieg des ABA-Gehaltes, auch in den knock down-Pflanzen, zu beobachten. Die ABA-Erhöhung unter Salzstress war zwar in RNAi-Pflanzen geringer als im Wildtyp und den Überexprimierern, jedoch insgesamt sehr deutlich. Der ABA3-Promoter zeigte keine Induktion unter Salz- und Trockenstress. Diese Ergebnisse indizieren eine geringe Bedeutung der AO bei der ABA-Biosynthese bei Pappel. Es können zwei Theorien aufgestellt werden, wie trotz nicht nachweisbarer AO-Aktivität in den ABA3-RNAi-Pflanzen ABA synthetisiert werden kann. Die NCED katalysiert in Arabidopsis den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der ABA-Biosynthese. Dies könnte auch für Populus gelten.

Möglicherweise sind aus diesem Grund geringste Mengen aktiver AO ausreichend, um große Mengen ABA zu produzieren. Andererseits ist ein alternativer Pathway über die Reduktion AB-Aldehyd zu AB-Alkohol und anschließende Oxidation zu ABA in der Diskussion. Microarrayanalysen ergaben keine klare Aussage, die für oder gegen den Shunt-Pathway sprechen.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmalig Modulationsstudien im letzten Schritt der ABA-Biosynthese für Pappel gezeigt werden. Es wird vermutet, dass die ABA-Biosynthese nicht nur in verschiedenen Pflanzenorganen und Entwicklungsstadien unterschiedlich reguliert wird, sondern auch in verschiedenen Spezies. Deshalb trägt diese Arbeit dazu bei, die Regulation der ABA-Synthese insgesamt und im Besonderen für holzige Arten zu klären.

5.0 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden Erdkulturpflanzen *A. thaliana* und *in-vitro*-, Hydroponik- und Erdkultur-Pflanzen von *P. x canescens* verwendet. Als Positiv-Kontrolle für GUS-Assays dienten mit einem 35S::GUS-Konstrukt stabil transformierte *N. tabacum*-Pflanzen. Vor der stabilen Transformation in *P. x canescens* wurden die erstellten Promoterkonstrukte mittels Infiltration in *N. benthamiana*-Erdkulturpflanzen getestet.

Für die Untersuchung der AO- und XDH-Aktivität, sowie des ABA-Gehaltes im saisonalen Verlauf wurden die beiden Pappelarten *P. x canadensis* und *P. deltoides* beerntet, die im Botanischen Garten Braunschweig stehen (Tab. 11).

Tab. 11: GPS-Daten von *P. x canadensis* und *P. deltoides*

<i>P. x canadensis</i>	GPS-Daten	<i>P. deltoides</i>
N52, 2712°	Breite	N52, 2684°
O10, 5310°	Länge	O10, 5338°
26 m	Genauigkeit	30 m
123 m	Höhe	114 m
36 m	Präzision	45 m

5.1.2 Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Sigma (Deisenhofen), Fluka (Schweiz), Serva (Heidelberg), Duchefa (Haarlem, Niederlande) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Restriktionsenzyme wurden von Promega (Mannheim) und Fermentas (St. Leon-Rot) geliefert. Es wurden DNA-Poly-merasen von PeqLab (Erlangen), Promega (Mannheim) und Biorad (München) eingesetzt. Zur Plasmid und DNA-Isolation wurden Kits der Firma Qiagen (Hilden), Sigma (Deisenhofen) und Macherey-Nagel (Düren) verwendet.

5.1.3 Organismen-Stämme

Tab. 12: Überblick über die verwendeten Bakterienstämme

Organismus	Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i>	DH5 α	<i>F</i> , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> <i>relA1</i> , <i>recA56</i>	Klonierung Transformation Amplifikation	Clontech, Hanahan, 1983
<i>E. coli</i>	HB101	<i>supE44 hsdS20 (rB- mB-)recA13 ara-14 proA2 lacY1galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 mitpRK2013 kanR</i>	Triple mating – Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	Ditta et al., 1980
<i>A. tumefaciens</i>	C58C1pMP90	<i>intrachrom. Rif^R und residentem pMP9 –GentR</i>	Triple mating - Transformation von <i>P. x canescens</i> und <i>N. benthamiana</i>	Koncz und Schell (1986)

5.1.4 Plasmide und Primer

Die genutzten Primer (Tab. 14) wurden von Sigma-Genosys (Steinheim, Deutschland) bezogen. Die eingetrockneten Oligonukleotide wurden in 5 mM Tris-Puffer (pH 8,0) entsprechend den Herstellerangaben, so dass sie in einer Konzentration von 100 μ M vorlagen. Die Lagerung der Primer erfolgte bei - 20°C.

Tab. 13: Auflistung der genutzten Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Verwendung	Quelle/Referenz
pBIN19	Pflanzen-Resistenzgen: <i>hptII</i> Bakterien-Resistenzgen: <i>kan</i> Lac Z alpha	transiente und stabile Transformation von Pflanzenmaterial	Bevan, 1984
pCK	Bakterien-Resistenzgen: <i>amp</i> , enthält RNAi-Konstrukt	Reduzierung des <i>ao</i> - und <i>aba3</i> -Transkripts	Meyer et al., 2004
pRT-103-GUS	Selektionsmarkergen: <i>amp</i> , Reportergen <i>gusA</i>	Promoterstudien	Kuchernig, 2007
pENTR-MCS	Selektionsmarkergen: <i>amp</i>	Entry-Vektor für Gateway- Klonierungen	Ratke, 2006
pKGWFS7	Selektionsmarkergen: <i>sm</i> , <i>kan</i> Reportergen: <i>gusA</i> , <i>gfp</i>	Destinationvektor für Gateway- Klonierungen, Binärvektor	Invitrogen, Karlsruhe- Deutschland
pGEM-T Easy	Selektionsmarkergen: <i>amp</i> , Reportergen <i>lacZ</i> mit interner <i>multiple cloning site</i> , welche durch T7- und Sp6-RNA- Polymerase-Promotoren flankiert wird	Klonierung, Sequenzierung	Promega, Mannheim- Deutschland
pJET1.2/blunt	Selektionsmarkergen: <i>amp</i>	Klonierung, Sequenzierung	Fermentas, St. Leon-Rot - Deutschland

Tab. 14: Liste der genutzten Primer und ihr Verwendungszweck

Bezeichnung	Sequenz 5' 3'	Verwendungszweck
JP-RNAi-ABAfor	TTGGATCCTCGAGTTCCTGACATGTGCTCTATTAGT	Amplifikation des ABA3-RNAi-Fragments mit Intron
JP-RNAi-ABArev	TTCCATGGAATTCAATCTGTTGTTGAGGTCGGACAC	Amplifikation ABA3-RNAi-Fragment mit Intron
JP-FusRNAi-ABAfor	ACTGATTTTGAAGAGAATGATGTGCGACTTGTGG	Fusions-PCR zur Amplifikation des ABA3-RNAi-Fragments
JP-FusRNAi-ABArev	GACATCATTCTCTTCAAAATCAGTATTACCATAACC	
MO/JP35-Sfor	GCAAGTGGATTGATGTGATATCTCC	Sequenzierung des pCK mit RNAi-Kassette
JP_35S-Primer-for	ACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC	PCR-Nachweis des AO- und ABA3-RNAi-Fragmentes
JP_Intron2-2-rev	GCTGTCGGCTTTCAAAGCTGTACG	
JP_ABA3_RT-PCR_for	GGCTCGAGTAGGTTTGCAACATGATCG	Primer ABA3-RT-PCR
JP_ABA3_RT-PCR_rev	CTGTTGTTGAGGTCGGACACACTCTCC	
JP_ABA3::GUS_for2	CAATTGGGTGTTGTTCTGCCGGG	PCR-Nachweis des ABA3::GUS-Fragmentes
JP_GUS_Ecoli_uidA_rev	TCGGTAATCACCATTCCCGGCGGG	
JP_35S-Primer-for	ACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC	PCR-Nachweis des GFP/aba3-Fragmentes
JP-GFP/aba3rev2	ATGCCGTTCTTCTGCTTGTCGGCC	
MO/JP35-Sfor	GCAAGTGGATTGATGTGATATCTCC	PCR-Nachweis des AAO3-Fragmentes
JP_AAO3-rev	ATAGTAACCTGTACCCGTGAAGCC	
JP-35S-AAO3-RT-for	AAACCTCCTCGGATTCCATTGCCC	AAO3-Nachweis der genomischen DNA
JP-neuAAO3-RT-for	TCCGATTCATAAGCGGTTGCGGG	AAO3 Nachweis der cDNA + genomischer DNA durch RT PCR
JP-neuAAO3-RT-rev	CTACCCGAGTTTCGGATAGAACGG	Rev Primer für JP-35S-AAO3-RT-for und JP-neuAAO3-RT-for
RHPTAOfor	AAGGATCCTCGAGTGCCTGTTGTGCATGAAG	Amplifikation AO-RNAi-Fragment
RHPTAOrev	AACCATGGAATTCAAGTCAGGGACAAAGAAAG	
JP-AAO2-for	GCCTCTGTGGTACCTGAAGATGGC	Primer für PtAO2-RT-PCR
JP-AAO2-rev	TTCCACCGAAGCCTCCTCCAACCC	
2JKAOafw	GGAAGTCAATTGGCTGTTGACATT	äußerer Primer für nested PCR des AO-Promoters
JKAOarev	CTGTGTTTTTGTGTCTGCGTCAG	
neu2JPAOafor	AACCCATCCAACCTTGATGGCCACC	innerer Primer für nested PCR des AO-Promoters
JKAOirev	TTGGATCCACAGCGAGCGCATAAGAAGCTGGC	

5.1.5 Antikörper

5.1.5.1 Primäre Antikörper

Es wurden zwei verschiedenen GFP-Antikörper genutzt, der Living Colors® Full-Length A.v. Polyclonal Antibody (Clontech) (Verdünnung 1:500) und Anti-GFP rabbit Polyclonalserum (Invitrogen, USA) (Verdünnung 1:750).

Die polyklonalen Antikörper gegen AAO1 und ABA3 wurden freundlicher Weise von F. Bittner zur Verfügung gestellt (1: 500 verdünnt).

5.1.5.2 Sekundärer Antikörper

Es wurde nur der AP-gekoppelter anti-rabbit-Antikörper (Sigma) benutzt, der 1: 7500 verdünnt wurde.

5.2. Methoden

5.2.1 Arbeiten mit RNA

5.2.1.1 RNA-Isolation aus Pappel (modifiziert nach Chang et al., 1993)

Für die RNA-Isolation wird 100 mg Pflanzenmaterial abgewogen, das mit Stickstoff gemörsert wurde. In der Vorbereitung muss der CTAB-Extraktionspuffer mit 15 µl β-Mercaptoethanol versetzt und im Heizblock auf 65°C erhitzt werden. Im nächsten Schritt werden 750 µl des CTAB-Extraktionspuffers zu dem gemörserten Pflanzenmaterial gegeben. Das Gemisch wird bis zur vollständigen Resuspension bei RT gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 3 min im Heizblock (65°C) wird erneut für 1 min gevortext (RT). Danach sind augenblicklich 750 µl eines Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (24:1) hinzuzufügen und durch 30 sekündiges Invertieren erfolgt das Mischen. Nach einer Zentrifugation (10.500 rpm, 10 min, RT) wird die obere Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, erneut 750 µl des Chloroform-Isoamylalkoholgemisches zugegeben und 30 s invertiert. Es folgt wiederum eine Zentrifugation (10.500 rpm, 10 min, RT) und die Überführung des Überstandes in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Nach der Zugabe von Lithiumchlorid (¼ des Volumens) wird die RNA über zwei Nächte bei 4°C gefällt. Nach dieser Zeit wird das RNA-Gemisch zentrifugiert (10.500 rpm, 30 min, 4°C). Der Lithiumchloridüberstand wird verworfen. Die weiteren Isolationsschritte werden mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Die RNA wird in 450 µl RLT-Puffer resuspendiert. Die Zugabe erfolgt ohne β-Mercaptoethanol, da der CTAB-Extraktionspuffer bereits β-Mercaptoethanol enthielt, jedoch wird dafür aber 225 µl EtOH (96%) zugefügt. Das Gemisch wird auf die pinkfarbene Säule mit dem Collection Tube überführt, wobei das Pellet auf keinen Fall vergessen werden darf. Nach einer Zentrifugation (10000 rpm, 15 sec) wird der Durchfluss verworfen und das Collection Tube wiederverwendet. Als nächstes erfolgt die Zugabe von 700 µl Puffer RW1 und eine Zentrifugation (10000 rpm, 15 sec). Hiernach werden Durchfluss und das Collection Tube verworfen. Dann werden 500 µl RPE-Puffer zugefügt und nach einer erneuten Zentrifugation (10000 rpm, 15 sec) wird der Durchfluss verworfen und das Collection Tube wiederverwendet. Nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und einer Zentrifugation (14.000 rpm, 2 min) wird die Säule in neues Collection Tube

überführt und für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführen und die RNA in 2 Schritten durch Zentrifugation (10.000 rpm, 1 min) eluiert, im ersten Schritt durch 15 µl RNasefreies H₂O und im zweiten Schritt durch 10 µl RNasefreies H₂O. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt am NanoDrop 1000 (Peglab).

5.2.1.2 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde der Anleitung folgend mit dem iscript cDNA-Synthese-Kit (Biorad) durchgeführt.

5.2.2 Methoden der DNA-Analyse

5.2.2.1 CTAB-Methode (modifiziert nach Del Sal et al., 1989)

Mit Hilfe dieser einfachen und kostengünstigen Methoden kann man aus einer über-Nacht-Kultur von *E. coli* Plasmid-DNA für weitere Klonierungsschritte und Restriktionsverdauungen isolieren. Hierbei bildet die DNA mit dem CTAB einen löslichen Bromid-Komplex und ermöglicht die Abtrennung von Verunreinigungen.

- (1) 1,5 ml einer über Nacht gewachsenen *E. coli*-Kultur werden in einem Eppendorf-Gefäß pelletiert (1 min, 4.200 rpm, RT) und das Pellet mit 200 µl Lysis-STET-Puffer unter Vortexen resuspendiert.
- (2) Der Zellaufschluss erfolgt durch Zugabe von 4 µl Lysozym (50 mg/ml) durch 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wird das Enzym durch eine 45 sekündige Inkubation bei 95°C inaktiviert.
- (3) Die Zelltrümmer werden durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert (10 min, 15.000 rpm, RT) und das Pellet mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt.
- (4) Den Überstand versetzt man mit 10 µl CTAB/NaCl-Lösung (5% w/v CTAB, 0,2 M NaCl) und lässt die Mischung für 5 min bei RT inkubieren.
- (5) Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (10 min, 15.000 rpm, RT) wird das DNA/RNA-Pellet in 300 µl 1,2 M NaCl-Lösung resuspendiert und mit 1 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt. Durch eine 20 minütige Inkubation bei RT (oder eine 5 minütige Inkubation bei 37°C) erfolgt der Abbau der RNA durch das Enzym.
- (6) In das Eppendorfgefäß gibt man nun 750 µl eiskaltes 96% Ethanol und lässt die DNA für mindestens 20 min bei -20°C fällen. Nach der Zentrifugation (15 min, 15.000 rpm, 4°C) wird das Pellet zum Waschen mit 500 µl eiskaltem 70% Ethanol versetzt.
- (7) Durch eine weitere Zentrifugation (10 min, 15.000 rpm, 4°C) wird das restliche Ethanol entfernt. Das Pellet wird für ca. 20 min an der Luft getrocknet und in 20 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 8) gelöst.

5.2.2.2 Methode der alkalischen Lyse und Matrixbindung

Bei dieser Methode werden die *E. coli* Zellen durch NaOH aufgeschlossen und die Proteine durch SDS denaturiert. Nach einer Zentrifugation erfolgt die Abtrennung der DNA von den restlichen Bestandteilen der Zelle durch DNA-Bindung an einen speziellen Filter. Nach mehreren Waschschr

liegt hochreine Plasmid-DNA vor. Es wurde der GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma) zur Vorbereitung der DNA für die Sequenzierung genutzt. Zur Gewinnung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurde der „QIAGEN Plasmid Midi & Maxi Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

5.2.2.3 genomische DNA-Isolation aus Pappel

Die genomische DNA wurde mit dem DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Diese Methode bedient sich der Abtrennung von präzipitierten Proteinen und Polysacchariden mittels einer Säule und anschließender Bindung der DNA an eine Membran. Dafür wird 100 mg Pflanzenmaterial abgewogen, nachdem es unter tiefkalten Bedingungen gemörsert wurde. Anschließend wird das Material nach Anweisung des Herstellers der DNA-Isolation unterzogen.

5.2.2.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) besitzt ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 260 nm im UV-Licht, hingegen besitzen aromatische Aminosäuren als Bestandteile der Proteine ein Maximum bei 280 nm. Dadurch ist die Trennung beider Zellinhaltsstoffe möglich. Mit Hilfe der Beziehung $OD_{260nm} = 1 \equiv 50 \mu\text{g/ml}$ DNA ist es möglich, die Konzentration zu ermitteln. Zur Bestimmung der Reinheit kann man ein Vergleich $OD_{260nm} : OD_{280nm}$ durchführen. Bei sauberer DNA beträgt dieses Verhältnis ca. 2:1.

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{OD_{260} \cdot 50 \cdot VF}{1000} \quad \text{bzw.} \quad c \left[\frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{OD_{260} \cdot 50 \cdot VF}{1000 \cdot M_w(\text{DNA})}$$

Zur Vermessung der DNA als Vorbereitung zur Sequenzierung wurde 5 μl DNA mit 995 μl ddH₂O vermischt und photometrisch vermessen. Den Wert bei 260 nm wurde mit dem Faktor 10 multipliziert, um auf die Konzentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu erhalten.

5.2.2.5 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration mittels Nanodrop

Neben der photometrischen Bestimmung der DNA erfolgte die Konzentrationsmessung mittels NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Peglab, Erlangen).

5.2.2.6 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine *in-vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese von spezifischen DNA-Sequenzen. Dafür kann als Original genomische DNA, cDNA oder Plasmid-DNA verwendet werden. Durch eine Denaturierung kommt es zur Trennung der Einzelstränge, die für die Bindung der spezifischen Oligonuceotide (Primer) notwendig ist. Die Primer flankieren den zu vermehrenden Abschnitt vom 3'-Ende her und dienen als Startpunkt für die DNA-Polymerase. Nach der Verdopplung der DNA erfolgt eine erneute Denaturierung und der Prozess beginnt wieder von vorn. Die Zyklenzahl liegt zwischen 20 und 60. Die Amplifikation erfolgt exponentiell, so dass am Ende aus wenigen pg DNA letztlich μg werden. Als DNA-Polymerase wird sehr häufig die Taq-Polymerase aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* verwendet, welche eine hohe Replikationsgeschwindigkeit aufweist, dabei aber häufig Fehler einbaut. Weniger fehleranfällig ist die Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*, welche allerdings keine hohe Geschwindigkeit aufweist. Ein entscheidender Parameter der PCR ist die Annealing-Temperatur der Primer, da diese einen hohen

Einfluss auf die Stabilität der Heteroduplex-DNA hat. Bei zu niedrig gewählter Temperatur erfolgt keine Anlagerung an den komplementären Strang oder es bilden sich Fehlpaarungen aus. Durch zu stringente Bedingungen (bis max. 68°C) ist die Wahrscheinlichkeit von Falschfragmenten noch höher. Diese Temperatur wird bestimmt durch die Primer-Länge und durch die Basenzusammensetzung.

Die PCR-Reaktion mit der Go-Taq-Polymerase enthält bei einem Reaktionsvolumen von 25 µl folgende Bestandteile:

5 µl	5 x Green Buffer
2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	dNTP (10 mM)
0,25 µl	Primer A (100 µM)
0,25 µl	Primer B (100 µM)
200 – 400 ng	Template-DNA
1,25 U	GoTaq-Polymerase
x µl	ddWasser
<hr/>	
25 µl	Reaktionsvolumen

Da bei jedem PCR-Lauf mehrere Proben parallel bearbeitet werden, ist es ratsam, aus den gleichbleibenden Bestandteilen einen Mastermix zu fertigen.

An der PCR-Maschine muss vor Beginn ein Programm ausgewählt oder erstellt werden. Dieses ist abhängig von der Art der PCR. Das Programm besteht im Allgemeinen aus 5 Einzelschritten:

5	min	95°C	}	20-60 Zyklen	DNA-Denaturierung
30	sec	95°C			DNA-Denaturierung
60	sec	56°C			Primer Annealing
60	sec	72°C			Elongation
10	min	72°C			Endsynthese
∞		4°C			Abschlusskühlung

Die Länge der PCR ist zyklusabhängig und dauert im Allgemeinen 3 bis 4 Stunden. Am Ende werden die Reaktionen bis zur manuellen Deaktivierung des Gerätes bei 4°C gelagert.

Zur Kontrolle der Reaktion wird ein Aliquot auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Sollte keine erwartete DNA-Bande oder nur diffuse Banden sichtbar sein, muss die PCR unter Variation der Parameter wiederholt werden. Eine mögliche Veränderung der Parameter ist ein Wechsel der Annealing-Temperatur. Bei Verwendung neuer Primer empfiehlt sich aus diesem Grund eine Gradienten-PCR zur Bestimmung der idealen Annealing-Temperatur.

5.2.2.7 PCR mit cDNA

Da nach der Synthese von cDNA aus RNA sehr wenig Template für eine folgende PCR vorliegt, wurde die Zyklenzahl auf 50 erhöht. Nach der Hälfte erfolgte eine zweite Zugabe von Polymerase, um eine gleichbleibende Effektivität der Strangsynthese zu gewährleisten. Tab. 15 zeigt die für verschiedene Template cDNA eingesetzten Primer mit den entsprechenden Annealing-Temperaturen.

Tab. 15: Eingesetzte Primer für cDNA-Analysen

Template cDNA	for-Primer	rev Primer	Annealingtemperatur
ABA3	JP_ABA3_RTPCR_for	JP_ABA3_RTPCR_rev	59°C
AAO3	JP-35S-AAO3-RT-for JP-neuAAO3-RT-for	JP-neuAAO3-RT-rev	59°C
PtAO2	JP-AAO2-for	JP-AAO2-rev	63,5°C

5.2.2.8 DNA-Verdau durch Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme sind spezifische Restriktionsendonukleasen TypII, die DNA hydrolytisch abbauen. Es kommen hierbei bakterielle Enzyme mit einer Erkennungssequenz von 4-8 Basenpaaren zum Einsatz, welche die Restriktionsschnittstelle erkennen und beide DNA-Stränge an dieser Stelle hydrolysieren. Viele Restriktionsschnittstellen stellen palindromische Sequenzen dar, die in 5'-3'-Richtung gelesen werden und auf beiden Strängen komplementär sind. Es sind auch Verdau mit zwei Enzymen oder mehr möglich, wenn diese im entsprechenden Restriktionspuffer ihre maximale Aktivität erreichen können. Folgende Bestandteile enthält ein Restriktionsansatz für den Verdau mit Promega-Enzymen:

0,5 – 1 µg	Plasmid-DNA
3 µl	10 x Reaktionspuffer
1 Unit	je Restriktionsenzym
x µl	ddH ₂ O
30 µl	Ansatz

Dieser Ansatz wird für 4-6 Stunden oder über-Nacht bei 37°C inkubiert.

FastDigest® Enzyme (Fermentas) stellen hochentwickelte Restriktionsenzyme für einen schnellen DNA-Verdau dar. Alle Enzyme sind 100% aktiv in einem universalen Puffer.

FastDigest®-Restriktionsansatz:

0,5 – 1 µg	Plasmid-DNA
1 µl	10 x Reaktionspuffer
1 Unit	je Restriktionsenzym
x µl	ddH ₂ O
10 µl	Ansatz

Dieser Ansatz wird für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

5.2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten mittels Ligase

Durch die Restriktionsenzyme werden die kovalenten Phosphodiester-Bindungen an spezifischen Stellen gespalten. Um die komplementären Enden eines Vektors und des Inserts verbinden zu können, wird das Enzym T4-DNA-Ligase (Promega) verwendet. Die Bindungsknüpfung erfolgt unter ATP-Hydrolyse. Für eine Ligation werden Vektor- und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt.

Ein Ligationsansatz enthält folgende Bestandteile:

50 ng	Vektor-DNA
150 ng oder mehr	Insert-DNA
1 µl	10x T4-Ligase-Puffer
0,3 U	T4-Ligase
x µl	ddH ₂ O
10 µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wird ÜN bei RT inkubiert. Anschließend kann die Transformation in *E. coli* erfolgen.

Eine Besonderheit ist die Ligation des Vektors pGEM®-T Easy der Firma Promega. Hierbei dürfen nur Taq-PCR-Amplifikate, die einen Adenosin-Überhang besitzen, als Insert-DNA verwendet werden. Dieser Vektor erlaubt durch Thymidin-Überhänge in der Multiple Cloning Site (MCS) einfaches Klonieren des Taq-Amplifikates.

Bei Ligation in den Vektor pJET1.2/blunt der Firma Fermentas ist bei Nutzen von Taq-PCR-Amplifikaten mit Adenosin-Überhang eine Entfernung dieser notwendig. Ein Blunting-Enzyme entfernt in einer 15-minütigen Inkubation bei 70°C die vorhandenen Adenosin-Überhänge. Der Vorteil von pJET1.2/blunt liegt vor allem in der Art der Selektion. Dieser Vektor trägt ein Gen für eine letal wirkende Restriktionsendonuklease (*eco47IR*) innerhalb seiner multiple cloning site. Das Leseraster dieses letalen Gens wird unterbrochen, wenn ein Insert innerhalb der MCS eingefügt wird. Es ermöglicht so transformierten *E. coli*-Zellen zu überleben, religierte Vektoren sind dagegen tödlich. Blunting-Reaktion und Ligation wurden wie folgt durchgeführt.

Blunting Reaktion	10 µl	2fach Reaktionspuffer	
	5-7µl	Insert-DNA	
	1 µl	DNA-Blunting-Enzym	
	x µl	ddH ₂ O (nucleasefrei)	
	18 µl	Reaktionsansatz	→ Inkubation: 15 min; 70°C

Ligation:	18 µl	Reaktionsansatz (oben)	
	1 µl	pJET1.2/blunt	
	1 µl	T4-DNA-Ligase	
	20 µl	Endvolumen	→ Inkubation: 1,5 h; 25°C

5.2.2.10 Gateway™-Klonierung

Die Gateway™ Cloning Technology ist ein Rekombinase-basiertes Klonierungssystem, das ohne Restriktionsendonukleasen und Ligasen auskommt (Harley et al., 2000). Das gewünschte Insert muss jedoch in einem Entry-Vektor vorliegen, in dem es von zwei spezifischen Rekombinationssequenzen flankiert wird.

BP-Reaktion

Die BP-Reaktion ermöglicht die Erstellung von Entryklonen. Ziel ist es, die zu untersuchende Sequenz in einem Entryklon mit attL-Sequenzen zu flankieren, um sie durch LR-Reaktion in verschiedene Vektorhintergründe einbringen zu können.

Vor der BP-Reaktion wird eine PCR durchgeführt, um das gewünschte Amplifikat mit *attB*-Sequenzen zu flankieren, die für die Klonierung in den Entryvektor nötig sind.

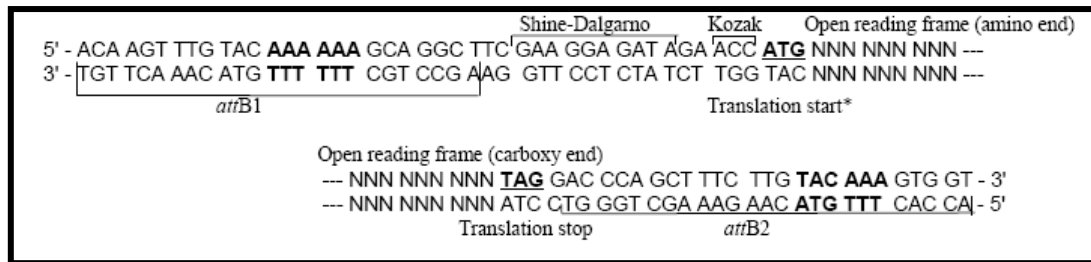


Abb. 72: *attB1* und *attB2*-Sequenzen für die BP-Reaktion (Abbildung aus Instruction Manual Gateway™ Cloning Technology, Life Technologies).

Die vor der BP-Reaktion nötige Aufreinigung des PCR-Produkts zur Entfernung der Primer erfolgte durch Agarosegelelektrophorese und anschließende Elution aus dem Gel. Für die BP-Reaktion ist das richtige molare Verhältnis von Donorvektor und PCR-Produkt entscheidend. Anhand der Größe des PCR-Produkts kann berechnet werden, welches Volumen bekannter Konzentration eingesetzt werden muss. 25 fmol DNA werden benötigt und wie folgt berechnet (x = Größe des PCR-Produkts in Basenpaaren):

$$25 \text{ fmol} = (0,0165 \cdot x) \text{ ng}$$

Nach Agarosegelelektrophorese eines Aliquots des Eluats wurde die Konzentration der DNA geschätzt und das einzusetzende Volumen berechnet.

Der Donorvektor pDONR/Zeo wurde von Invitrogen (Karlsruhe) erworben. Der BP-Reaktionsansatz wurde wie vom Hersteller angegeben (Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix, Invitrogen) pipettiert, dabei wurde das Gesamtvolumen auf die Hälfte verringert, um Kosten zu reduzieren:

75	ng	pDONR
25	fmol	<i>attB</i> -PCR-Produkt
x	µl	TE-Puffer
1	µl	BP-Clonase II
5	µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Elektroporation in DH5α.

LR-Reaktion

Mittels Rekombination zwischen *attL*- und *attR*-Sequenzen (LR-Reaktion) wird die zu untersuchende Sequenz aus dem Entryklon in den Vektorhintergrund eines Destinationvektors eingefügt, auf diese Weise entsteht ein Expressionvektor. Die im Destinationsvektor enthaltene Gateway-Kassette mit *ccdB* wird dabei entfernt. Die Rekombinationsreaktion wurde mit dem LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen) folgendermaßen durchgeführt, dabei wurde, wie auch bei der BP-Reaktion, aus Gründen der Kostenersparnis der Reaktionsansatz gegenüber den Herstellerangaben halbiert:

70-120	ng	Entryklon
75	ng	Destinationvektor
x	µl	TE-Puffer
1	µl	LR-Clonase II
5	µl	Gesamtvolumen

Die Reaktion wurde für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann zur Transformation von *E. coli* (DH5 α) eingesetzt (je 1 μ l).

5.2.2.11 DNA-Auftrennung im Agarose-Gel

Mit Hilfe dieser Trennmethode ist die Visualisierung von ungeschnittener und geschnittener DNA möglich. Agarose ist ein Kohlenhydrat-Polymer, welches aus Algen gewonnen wird. Es bildet im gel-förmigen Zustand ein dreidimensionales Netzwerk. Die genutzte Agarosekonzentration in 1x TAE-Puffer ist abhängig von der Größe der DNA, welche man untersuchen möchte. Sie variiert zwischen 0,7–1,3%, jedoch wird meistens 1% gewählt. Man gibt der Agarose Ethidiumbromid (EtBr) hinzu, welches in die DNA interkaliert und durch UV-Licht zu einer Lichtemission angeregt wird (1 μ l EtBr einer 10 mg/ml-Stammlösung in 100 ml 1x TAE-Puffer). Um Aussagen über die Größe der DNA-Fragmente machen zu können, erfolgt neben der zu untersuchenden DNA die gleichzeitige elektrophoretische Auftrennung eines DNA-Standards (1 kb-DNA-Leiter, Fermentas).

5.2.2.12 Elution von DNA aus Agarose-Gele

Verdaute DNA oder PCR-Amplifikationsprodukte, welche in einem Agarose-Gel elektro-phoretisch aufgetrennt wurden, können mit Hilfe eines Skalpells knapp ausgeschnitten und durch NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) aus dem Agarose-Gel isoliert werden. Die DNA wird nach dem Schmelzen der Agarose an eine Siliziummembran gebunden, diese mehrmals gewaschen und anschließend in 15-50 μ l 10 mM Tris, pH 8,0 eluiert. Der Kit wurde dem Herstellerprotokoll entsprechend durchgeführt.

5.2.2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde auf Grund der sehr guten Qualität und Länge der Sequenzen von der Firma MWG in Ebersberg nach einem modifizierten Kettenabbruchverfahren mit Didesoxyribonukleotiden (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde eine DNA-Konzentration von 0,1 μ g/ μ l eingestellt und 20 μ l in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und verschickt.

5.2.2.14 Transformation von *E. coli* mittel Elektroporation

Bei dieser Transformationstechnik werden mit Hilfe hoher Spannungen kurzfristig Poren in der Zellmembran gebildet, durch welche die DNA in die Zelle gelangen kann.

- (1) Für jeden Elektroporationsansatz wird 1 ml steriles LB-Medium auf 42°C erwärmt, die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und die Küvetten auf Eis gekühlt.
- (2) Der Elektroporator muss folgende Grundeinstellung besitzen:
 - 2,5 kV (Resistance)
 - R5/129 (Resistance timing, Values Ohms)
- (3) Man gibt 1-2 μ l Plasmid-DNA zu den kompetenten Zellen, überführt den Ansatz in die Küvetten, die von außen abgetrocknet und in den Schlitten des Elektroporators eingestellt werden.

- (4) Es ist sofort der Knopf „Power“ zu betätigen. Die Lampe „Automatic charge and pulse“ leuchtet rot. Die Küvette ist zu entnehmen und die Zellen müssen sofort in dem warmen Medium resuspendiert werden.
- (5) Die Zellsuspension wird in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 45 min bei 37°C auf dem Schüttelinkubator bei 200 rpm inkubiert.
- (6) Die Werte für die Pulsstärke in kV und die Pulszeit in ms sind zu notieren, da daraus Schlussfolgerungen über die Qualität der Transformation möglich sind. Um die Grundeinstellung des Gerätes wiederherzustellen wird der Knopf „Set charging voltage“ für ein paar Sekunden gedrückt.
- (7) Nach der Inkubationszeit werden die Zellen auf den Selektionsmedium ausplat-tiert und bei 37°C ÜN inkubiert.
- (8) Die Küvetten werden meistens nur einmal verwendet, da die Transformationsrate bei Mehrfach-verwendung rapide abnimmt. Zur Regeneration werden die Küvetten mit Wasser und Ethanol gereinigt.

5.2.2.14.1 Erzeugung von elektrokompetenten Zellen

- (1) Es werden 500 ml LB-Flüssigmedium mit 500 µl einer ÜN-Kultur von DH5α-Zellen beimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,5-0,8$ kultiviert.
- (2) Die Kultur wird anschließend 15 min unter Schütteln auf Eis gekühlt. Die Zellen werden dann pelletiert (15 min, 4.000 rpm, 4°C). Der Überstand wird verworfen.
- (3) Das Pellet wird in 400 ml eiskaltem, sterilen ddH₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4.000 rpm, 4°C) wird der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 200 ml eiskaltem, sterilen ddH₂O resuspendiert.
- (4) Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 4.000 rpm, 4°C) wird das Pellet in 25 ml sterilem ddH₂O resuspendiert.
- (5) Nach der folgenden Zentrifugation (15 min, 4.000 rpm, 4°C) wird das Pellet in 8 ml eiskaltem, sterilen 10% Glycerin resuspendiert.
- (6) Es erfolgt wiederum eine Zentrifugation (15 min, 4.000 rpm, 4°C), wobei das Pellet abschließend in 900 µl eiskaltem, sterilen Glycerin resuspendiert wird.
- (7) Es werden 40 µl Aliquots der Zellsuspension in kalte 1,5 ml-Eppendorfgefäße pipettiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen sind bei -70°C bis zu sechs Monate kompetent.

5.2.2.15 Arbeiten mit *A. tumefaciens*

Zur stabilen Transformation von Pflanzenmaterial wird das pflanzenpathogene Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* genutzt. Die Kultivierung erfolgt auf CPY-Platten mit zusätzlicher Zugabe von Rifampicin und Gentamycin nach Inkubation für 2 Tage bei 28°C. Flüssiges CPY-Medium (plus Antibiotika, 3 ml) wird anschließend mit einer Einzelkolonie angeimpft und erneut für 2 Tage bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Dies ist der Ausgangspunkt für die verschiedenen Transformationsmethoden.

5.2.2.15.1 Plasmidmobilisierung in *A. tumefaciens* (Triple Mating)

Die Plasmidmobilisierung in *A. tumefaciens* wird genutzt, um einen Binärvektor aus *E. coli*, der gleichzeitig einen Agrobacterium-spezifischen Replikationsursprung besitzt, in einen Agrobacterium-Stamm zu transferieren (Ditta et al., 1980). Für die Mobilisierung der Plasmid-DNA ist ein zusätzlicher *E. coli*-Stamm (HB101) nötig, der die notwendigen Transferegene enthält und so den Transfer ermöglicht.

Zur Vorbereitung des Triple Matings werden 5 ml CPY-Medium mit Rifampicin und Gentamycin mit dem Agrobakterien-Stamm angeimpft. Die Kultivierung erfolgt für 48 h bei 28°C. Die *E. coli*-Stämme werden ebenfalls in je 5 ml LB (plus Antibiotika) für 24 h bei 37°C kultiviert. Für das Triple Mating werden zu 5 ml CPY-Medium je 0,5 ml der *E. coli*-Stämme und 1 ml des Agrobacterium-Stamms gegeben. Es folgt eine Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm. Das Pellet wird in 0,5 ml CPY-Medium resuspendiert und die Lösung auf eine CPY-Platte (ohne Antibiotika) getropft. Nach der Kultivierung für 48 h bei 28°C wird eine Impföse Zellmaterial entnommen und in 0,5 ml CPY-Medium resuspendiert. Ausgehend von dieser Lösung wird eine Verdünnungsreihe bis 10^{-6} erstellt. Je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-5} werden auf CPY (plus Antibiotika) ausplattiert und für 48 h bei 28°C inkubiert. Auf diese Weise werden die Agrobakterien (Einzelkolonien) selektiert, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben.

5.2.2.15.2 Gesamt-DNA-Isolierung aus *A. tumefaciens*

Zur Kontrolle der Übertragung des Plasmids in die Agrobakterien die Gesamt-DNA aus den Agrobakterien isoliert und in *E. coli* retransformiert.

Zunächst wird eine 3 ml CPY-Flüssigkultur angeimpft und 48h bei 28°C kultiviert. 2 x 1,5ml der Kultur wird bei 6500 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit je 500 µl Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) gewaschen und schließlich in 600 µl Agro-DNA-Extraktionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl Proteinase K (5 mg/ml) wird intensiv gevortext und 160 µl 10% SDS zugesetzt. Das Gemisch wird für 1 h bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird 500 µl Phenol/Chloroform (im Verhältnis 1:1) zugegeben. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation (15000 rpm, 4°C, 20 min). Die Oberphase wird abgenommen und mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt, wodurch die Gesamt-Agro-DNA präzipitiert. Nach der Pelletierung durch eine Zentrifugation (15000 rpm, 4°C, 20 min) wird der Überstand entfernt. Das getrocknete Pellet wird in 20 µl Tris-Puffer (10 mM; pH 8,0) aufgenommen und die DNA in *E. coli* transformiert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA wird aus *E. coli* isoliert wird diese durch Restriktionsverdau überprüft. Die so getesteten Agrobakterien-Stämme stehen zum Gentransfer in Pflanzenmaterial bereit und können als Glycerin-Stammkultur bei -70°C gelagert werden.

5.2.2.16 Anlegen von Glycerol-Kulturen

Damit bestimmte Bakterien-Klone für spätere Arbeiten weiterhin zur Verfügung stehen, wird 800 µl des Kulturmaterials einer ÜN-Kultur (*E. coli*) oder einer 48 h-Kultur (*A. tumefaciens*) mit 200 µl sterilem 100%igen Glycerol versetzt und gut vermischt. Die entstandene Bakterien-Suspension wird nach dem Mischen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

5.2.3 Klonierung der Konstrukte

5.2.3.1 Klonierung des AO-Promoter-Konstruktes

Der AO-Promoter wurde mittels einer nested-PCR aus genomischer DNA von *P. x canescens* amplifiziert. Für die erste PCR wurden als äußere Primer 2JKAOafw und JKAOarev bei einer Annealingtemperatur von 58°C und 30 Zyklen genutzt. Von dieser PCR wurden 5 µl des 25 µl Ansatzes für die zweite PCR verwendet. Die inneren Primer waren neu2JPAOafor und JKAOirev (Annealingtemperatur 58°C, 30 Zyklen). Das Fragment wurde in den Vektor pJET1.2/blunt eingebracht und sequenziert. Da die folgende Klonierung mittels GATEWAY-Klonierung erfolgen sollte, wurde der Promoter in den pENTR-MCS eingebracht. Dazu wurden die Restriktionssites *Bam*HI und *Xho*I genutzt. Durch eine LR-Reaktion wurde der AO-Promoter in den Binärvektor pKGWFS7 kloniert, der das Reportergen GUS enthält. Dieser Vektor diente für die stabile Transformation mit *A. tumefaciens*.

5.2.3.2 Klonierung des ABA3-RNAi-Konstruktes

Das ABA3-RNAi-Fragment wurde aus genomischer DNA von *P. trichocarpa* amplifiziert. Für die Erstellung eines ungefähr 400 bp großen Fragmentes war die Fusion zweier Exons, LG_VII|7136650|7136823 (174 bp) und LG_VII|7137117|7137323 (207 bp), notwendig. Zuerst wurden die Exons mit dem sie trennenden Intron (268 bp) mit den Primern JP-RNAi-ABAfor und JP-RNAi-ABArev amplifiziert (Annealingtemperatur 56°C, 25 Zyklen). Durch eine Fusions-PCR wurden die Exons fusioniert, in dem zwei weitere Primer in der PCR eingesetzt wurden, die das Intron überbrücken (JP-FusRNAi-ABAfor und JP-FusRNAi-ABArev). Nach Einbringen in den Subklonierungsvektor pGEM-T-easy (Promega) wurde das Fragment sequenziert. Mit den äußeren Primern wurden Restriktionsschnittstellen angefügt: mit dem for-Primer *Bam*HI/*Xho*I und dem rev-Primer *Nco*I/*Eco*RI. Diese Schnittstellen erlauben die Klonierung in die RNAi-Kassette im pCK (Meyer et al., 2004). Durch Restriktion mit *Xho*I und *Eco*RI des Fragmentes kann das sense-Fragment und durch *Nco*I und *Bam*HI das antisense-Fragment in den ebenfalls geschnittenen Vektor ligiert werden (Abb. 73). Durch eine weitere Restriktion des pCK mit *Hind*III konnte die gesamte RNAi-Kassette eluiert werden und in den ebenfalls mit *Hind*III geschnittenen pBIN19 ligiert werden. Dieser Vektor wurde dann für die stabile Transformation mit *A. tumefaciens* genutzt.

Sequenz des ABA3-RNAi-Fragmentes:

```
GTTCTGACATGTGCTCTATTAGTGCTTATATTGACCTCAATAAGGGAATAATGTTTGTAGAATCCCCTCGATG
TAGAGAAAAATTGGAGATCAACCTGAAGACAGATTCATATCCAGGTGGGATAGAGGAGATTGAGTTGCATGC
CCAGAGGTATGGTAATACTGATTTTGAAGAGAATGATGTCGACTTGTGGTTTAGCCGTGCTGTTGGCCATCCT
TGCTCTTTATTAAGATGTTGTAGTTCCAGAACTTCCAGCTTGAAGAAGAATAAAAGCAGGAAGTTGTGCA
GAGATGTGGAGAGCAGATTGAATTTTGCCAATGAAGCTCAGTTCTTATTGATATCAGAGGAGAGTGTGTCCG
ACCTCAACAACAGATTG
```

5.2.3.3 Klonierung des AO-RNAi-Konstruktes

Das AO-RNAi-Fragment wurde aus cDNA von *P. trichocarpa* mit Hilfe der Primer RHPTAOfor und RHPTAOrev amplifiziert (Annealingtemperatur 55,3°C, 40 Zyklen). Nach der Ligation in den Vektor pGEM®-T Easy (Promega), wurde das Fragment sequenziert. Mit Hilfe der Schnittstellen *Xho*I und *Eco*RI konnte es als sense Fragment in die bestehende RNAi-Kassette im pCK kloniert werden (Meyer et al., 2004), das antisense-Fragment wurde durch die Restriktionssites *Nco*I und *Bam*HI

eingbracht (Abb. 73). Nach einer Restriktion der vollständigen AO-RNAi-Kassette mit *Hind*III erfolgte die Ligation in den Binärvektor pBIN19. Nach Übertragung des Vektors in *A. tumefaciens* wurde die Transformation in *P. x canescens* durchgeführt.

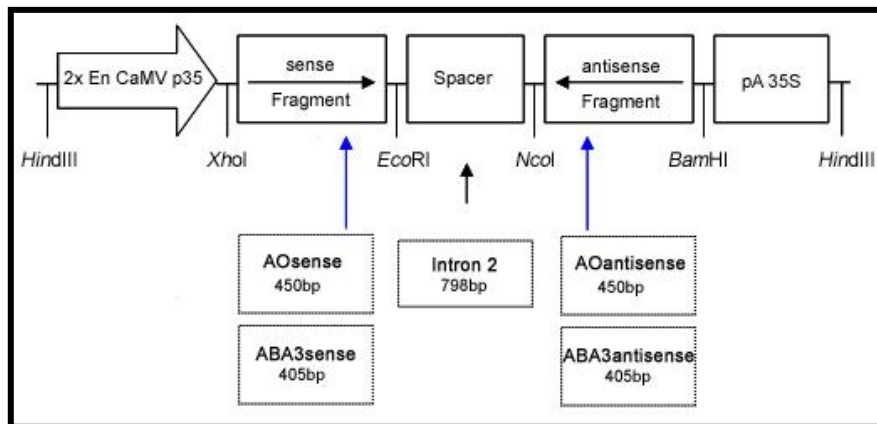


Abb. 73: Klonierungsstrategie der ABA3- und AO-RNAi-Fragmente in die RNAi-Kassette im pCK.

5.2.4 Biochemische Methoden

5.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Für die nachfolgenden biochemischen Untersuchungen ist die Bestimmung der Proteinkonzentration unerlässlich.

Die Methode nach Bradford ist ein indirektes spektroskopisches Verfahren, welches auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 im sauren Milieu von 465 nm zu 595 nm durch Proteininteraktionen entsteht. Es erfolgt eine Stabilisierung der anionischen Form des Farbstoffes durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen, vor allem mit den Arginin-Resten, aber auch mit den Histidin-, Lysin-, Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalanin-Resten. Hierbei sollten detergenzfreie Proteinlösungen ohne SDS und Triton X-100 eingesetzt werden, da es zu Interferenzen kommen kann. Die Quantifizierung wird zusammen mit einer Referenz aus proteinfreiem Probenpuffer und Bradford-Reagenz (1:5 mit ddH₂O verdünnt) in 1 ml Kunststoffküvetten durchgeführt. 1-2 µl Proteinlösung werden mit 999-998 µl Bradford-Reagenzlösung versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation im Dunkeln wird die OD₅₉₅ mittels Photometer vermessen. Anhand einer BSA-Standardkurve kann ein Proteinwert von 20 µg/µl bei einer OD₅₉₅ von 1 festgelegt werden. Dieser Wert dient zur Bestimmung des Proteingehalts der vermessenen Proben.

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{\text{OD}_{595}}{x \mu\text{l Probe}} \cdot 20$$

5.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Wie bei der DNA-Auftrennung durch Elektrophorese im Agarosegel erfolgt die Auftrennung der Proteine mittels der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Größe durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Durch SDS-Anlagerung erhalten alle Proteine eine negative Ladung, so dass die Auftrennung unter denaturierenden und reduzierenden Parametern nur noch von der Molekülgröße abhängt. Die beim SDS-PAGE verwendeten Polyacrylamidgele wirken als Molekularsieb und sind in der Porengröße durch die Veränderung der Polyacrylamidkonzentration variabel.

Durch Verwendung von einem großporigen Sammelgel mit niedrigem pH-Wert und Ladungsträgermangel erfolgt die Aufkonzentrierung der Proteine. Im nachfolgenden Trenngel mit höherem pH-Wert werden die Proteine aufgetrennt.

(A) Herstellung von SDS-Gelen:

Die SDS-Gele der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wurden nach Laemmli (1970) vorbereitet. Die Ausmaße der Minigele betrugen 50x80x0,75 mm.

- (1) Das Trenngel wird entsprechend der Angaben zusammenpipettiert, wobei TEMED als Stabilisator und APS als Starter für die radikalische Polymerisationsreaktion zum Schluss hinzugegeben werden müssen. Die Mischung wird in die vorbereitete Gelapparatur gefüllt und zum Erzielen einer ebenen Oberkante mit 1 ml ddH₂O überschichtet.

7,5% Trenngel

3580	µl	ddH ₂ O
2700	µl	Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)
2720	µl	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
108	µl	10% SDS
40	µl	0,5 M EDTA pH 8,0
16	µl	TEMED
40	µl	10% APS
9204	µl	

- (2) Das Trenngel polymerisiert innerhalb 1 h vollständig und kann danach sofort verwendet oder bei 4°C in feuchtem Papier gelagert werden.
- (3) Zum Gießen des Sammelgeles wird das überschichtende ddWasser entfernt. Die Sammelgellösung wird frisch angesetzt und bis zur Oberkante der Gelplatten eingefüllt. Der Probenkamm wird anschließend luftblasenfrei eingesetzt. Das Sammelgel sollte nicht länger als einen Tag vor der Verwendung gegossen werden.

Sammelgel

2360	µl	ddH ₂ O
640	µl	Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)
1000	µl	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
40	µl	10% SDS
20	µl	0,5 M EDTA pH 8,0
8	µl	TEMED
40	µl	10% APS
4108	µl	

- (4) Die vollständige Polymerisation des Sammelgeles erfolgt innerhalb von 15 bis 30 min. Das fertige Gel wird mit 1x Laufpuffer überschichtet, der Gelkamm entfernt und die vorbereiteten Proben können aufgetragen werden.
- (5) Nach Auftragung der Proben und des Proteinstandards lässt man das Gel bei einer Spannung von 200 V und maximaler Stromstärke (75 mA) für ca. 1–1,5 h unter Wasserkühlung laufen.

(B) Vorbereitung der Proben zur Elektrophorese:

Ladepuffer muss zu den Proteinproben gegeben werden, um Protein auf dem Gel auftrennen zu können. Dieser enthält SDS zur negativen Aufladung und Zerstörung der kovalenten Wechselwirkungen der Proteine, β -Mercaptoethanol zur Reduktion der Disulfidbrücken, Glycerin zur Protein-solubilisierung und Probenbeschwerung sowie Bromphenolblau als Markierungsfarbstoff der vorderen Lauffront. Nach Zugabe des Ladepuffers werden die Proben für 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert, kurz abzentrifugiert und anschließend auf Eis bis zum Beladen des Gels aufbewahrt.

5.2.4.3 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Einige Proteine wie die Aldehydoxidase (AO) können im PA-Gel durch eine von ihnen katalysierte Reaktion nachgewiesen werden. Dazu müssen die Proteine in nativer Form vorliegen, was die Verwendung von Gelen notwendig macht, in denen sich keine denaturierenden Substanzen wie SDS oder β -Mercaptoethanol befinden. Des Weiteren ist nur in der nativen PAGE eine Trennung der verschiedenen AO-Isoformen von *A. thaliana* möglich, die auch für immunologische Nachweise von Interesse ist.

Eine native PAGE dient nicht vorrangig dem Auftrennen von Proteinen nach ihrer Größe sondern vielmehr der Konzentrierung dieser im Gel, wodurch die anschließende Aktivitätsfärbung erleichtert und intensiviert wird. Native Gele werden wie SDS-Gele hergestellt. Allerdings wird dabei das SDS und EDTA durch ddH₂O ersetzt. Die Elektrophorese findet in 1 M Tris/Glycin-Puffer statt und wird beendet, wenn die Bromphenolblau-Front das Gelende erreicht hat. Der Einsatz eines Längenstandard ist nicht möglich, da das Laufverhalten der Proteine neben der Größe auch von der eigenen Ladung abhängig ist, die durch den isoelektrischen Punkt bestimmt wird.

5.2.3.4 Proteintransfer auf eine Trägermembran (Western-Blot)

Beim Western-Blot wird die negative Ladung der aufgetrennten Proteine genutzt, um sie auf eine positiv geladene Membran zu transferieren. Die effizienteste Transfermethode ist der Blot durch Strom. Dazu wurde die Blotapparatur „The Panther™ Semidry Electrobloetter“ von Owl Separation Systems genutzt. Der Western-Blot wird wie folgt durchgeführt:

- (1) Die auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran wird kurz mit 100% Methanol benetzt, für 5 min mit ddH₂O gewaschen und für 10 min in Transferpuffer äquilibriert.
- (2) In der Zwischenzeit werden 6x Whatman 3MM-Filterpapiere auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer kurz äquilibriert.
- (3) Nach der PAGE wird das Trenngel hinsichtlich der Orientierung gekennzeichnet und in Transferpuffer gegeben.
- (4) Aufbau des Blottes (luftblasenfrei):

Kathode (+)



3 x Whatman-Papier

Gel

Membran

3 x Whatman-Papier



Anode (-)

- (5) Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgt bei ca. 200 mA für 2 h. Bei der Berechnung der Stromstärke wurde der Wert 3 mA/cm^2 zu Grunde gelegt.

5.2.4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nachdem der Transfer der Proteine auf die Membran durchgeführt wurde, kann nun der spezifische Nachweis mit Hilfe von Antikörpern erfolgen. Die Antikörper (AK) erkennen ganz bestimmte Bereiche an einem Protein, die sogenannten Epitope (ca. 6-10 AS). Durch Zugabe von spezifischen Antikörpern (primäre AK) zur Membran erfolgt die Erkennung des gesuchten Proteins. Um diese AK zu visualisieren, wird noch ein zweiter AK (sekundärer AK) hinzugegeben, an den eine spezielle Markierung angebracht ist. Durch den Sekundärantikörper wird noch eine Verstärkung des Primärsignals erreicht, da mehrere AK an einem einzigen Primärantikörper binden können. Am häufigsten ist der Sekundärantikörper mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt und ermöglicht eine Farbreaktion. Hierbei wird das chromogene Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidin-Salz (BCIP) dephosphoryliert und führt zum Ausfall eines lila-blauen Farbstoffes, wobei der Reaktionslösung zugegebenes Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT) zur Farbverstärkung dient.

- (1) Bei Verwendung eines ungefärbten Markers wird die Membran nach Inkubation von 5 min in 1x TBS mit Ponceau angefärbt (Ponceaukonzentrat (Sigma) 1:1000 verdünnen in ddH₂O). Nach der Markierung der Markerbanden mit einem weichen Bleistift erfolgt die Entfärbung mit TBSTXS und ein dreimaliges Spülen in ddH₂O.
- (2) Nach der Absättigung der Blotmembran mit Blockierungslösung (1 h, RT), erfolgt die Inkubation mit dem 1. Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur. Die Verdünnungen der AK sind mit Blockierungslösung herzustellen (siehe 5.1.5).
- (3) Durch 15 minütiges Waschen in TBST wird der überschüssige AK nach der Inkubation von der Membran entfernt. Darauf folgt ein dreimaliges Spülen mit ddH₂O sowie für 10 min mit 0,8% NaCl-Lösung. Durch erneutes dreifaches Spülen mit ddH₂O und einer 5 minütigen Inkubation mit Blockierungslösung wird die Membran für den sekundären AK vorbereitet.
- (4) Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgt wiederum für 1 h bei 37°C.
- (5) Nach Beendigung der Inkubationszeit wird die gleiche Waschprozedur wiederholt wie unter (2) beschrieben. Hierbei wird aber keine weitere Inkubation in Blockierungslösung angeschlossen, sondern die Farbreaktion.

- (6) Die Färbelösung der AP-Reaktion wird aus 10 ml AP-Reaktionspuffer, 66 µl NBT und 33 µl BCIP hergestellt und auf die Membran gegeben. Die Farbreaktion verläuft bei RT im Dunkeln.
- (7) Bei Beginn einer unspezifischen Hintergrundfärbung muss die Farbentwicklung durch Abgießen der Reaktionslösung und spülen mit ddH₂O abgestoppt werden. Zur Dokumentation des Ergebnisses wird die Membran getrocknet und kann dann entsprechend verwendet werden.

5.2.5 Physiologische Untersuchungen

5.2.5.1 AO- und XDH Aktivitätsbestimmung mittels eines *in-gel*-Assays

Die katalytischen Aktivitäten der AO und XDH können nach einer nativen PAGE durch eine Farb-reaktion nachgewiesen werden (Hesberg et al., 2004; Koshiba et al., 1996). Die AO oxidiert unter anderem die Substrat Indol-3-carbaldehyd, die XDH hingegen Hypoxanthin und Xanthin. Das auch zugegebene chromogene MTT wird dabei zu einem unlöslichen blauen Farbstoff reduziert. Dieser ausgefallene Farbstoff kann als blaue Farbstoffbande erkannt werden.

Nach Mörsern im eiskalten Zustand wird das Pflanzenmaterial in gekühlte 1,5 ml-Eppendorf-Cups zu Portionen von 100-200 mg abgewogen. Nachfolgend wird es mit 1-2 Volumen Extraktionspuffer (100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,5; 2 mM EDTA, pH 8,0 und 5 mM DTT) versehen und einer zweimaligen Behandlung mit Ultraschall (Branson Sonifier, Mikrospitze) für je 30 sec unter ständiger Eiskühlung unterzogen. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation (15000 rpm, 20 min, 4°C) pelletiert. Für die Auftrennung im nativen 7,5%-igen Trenngel (Laemmli, 1970) werden 80-250 µg Protein aus den Rohextrakten mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer aufgetragen.

Die Gelelektrophorese verläuft unter Kühlung bei 120 V in einem Tris/Glycin-Laufpuffer bis die Ladepuffer-Lauffront die untere Kante des Gels erreicht.

Währenddessen wird die Färbelösung aus folgenden Komponenten hergestellt:

AO-Färbung:

30 ml	100 mM K-Phosphatpuffer pH 7,5
15 mg	Indol-3-carbaldehyd (entspricht einer Minispatelspitze)
18 mg	MTT (entspricht einer Minispatelspitze)
75 µl	PMS (Stammlösung 1 mg/ml)

XDH-Färbung:

30 ml	250 mM Tris/HCl, pH 8,5
15 mg	Xanthin (entspricht einer Minispatelspitze)
15 mg	Hypoxanthin (entspricht einer Minispatelspitze)
18 mg	MTT (entspricht einer Minispatelspitze)
75 µl	PMS (Stammlösung 1 mg/ml)

Die Färbung erfolgt aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Phenazinmethosulfat (PMS) im Dunkeln und kann jederzeit abgebrochen werden, indem die Färbelösung durch Wasser ersetzt wird. Die Färbung fand immer über Nacht statt.

5.2.5.2 Fluorimetrischer GUS-Assay

Die GUS-Expression wird durch fluorimetrische GUS-Assay quantitativ vermessen (Jefferson et al., 1987). Dazu werden 100 mg Blattmaterial mit 150 µl GUS-Extraktionspuffer in einem 1,5 ml-Eppendorf-Cup versetzt und zum Zellaufschluss zweimal 30 sec mit Ultraschall (Branson Sonifier, Mikropitze) unter ständiger Eiskühlung behandelt.

Der Ansatz wird 15 min mit 15000 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Protein-Überstand in ein neues 1,5ml-Eppendorf-Cup überführt und auf Eis gestellt. Bei Blattproben werden 2-5 µl, des Überstands zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt. Anschließend wird eine Enzymkinetik aufgenommen. Dazu werden 50 µl des Proteinüberstands mit 450 µl GUS-Reaktionspuffer vermischt und bei 37°C inkubiert. Für den Nullwert werden sofort 50 µl abgenommen und in 950 µl Stopp-Puffer überführt. Nach jeweils 10, 20 und 30 min werden erneut 50 µl aus der Lösung entnommen und in 950 µl Stopp-Puffer gegeben. Die MUG-Umsatz-Messungen erfolgen am Fluorimeter (Excitation bei 365 nm, Emission bei 455 nm). Die GUS-Aktivität ist definitionsgemäß die Menge 4-MUG, die pro Stunde umgesetzt wird. Mathematisch lässt sich die GUS-Aktivität nach der folgenden Formel berechnen:

$$y = b(x)$$

y = Substratumsatz [nmol/min]; x = Zeit [min]; b = Steigung der linearen Regression

Der Wert b lässt sich graphisch als Steigung der Geraden, die durch die Messwerte gelegt wird, oder mathematisch als Koeffizient einer linearen Regression erhalten. Um die GUS-Aktivität in der Einheit nmol h^{-1} zu erhalten, wird der berechnete Wert b mit 60 [min] multipliziert und durch die ermittelte Proteinmenge [mg] geteilt. Das Resultat ist die Aktivität [$\text{nmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$], der so genannte 60-Minuten-Wert.

5.2.5.3 Histochemischer GUS-Assay

Zur Lokalisation der GUS-Expression in verschiedenen Geweben wird der histochemische GUS-Assay nach Jefferson et al. (1987) durchgeführt. Dabei dient X-Gluc als Substrat für die β -Glucuronidase, welche X-Gluc zu Glucuronsäure und hydrolysiert. 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird vom Luftsauerstoff zu einem tiefblauen Indigofarbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) oxidiert, weshalb ein Luftabschluss während der Reaktion zu vermeiden ist. Durch mikroskopische Untersuchung kann so die GUS-Expression in lebenden Zellen nachgewiesen und lokalisiert werden. Das verwendete Pflanzenmaterial wird in 2 ml Eppendorfgefäßen oder in 15 ml Probenröhrchen gegeben und mit GUS-Färbelösung so versetzt, dass das gesamte Blattmaterial überschichtet ist. Die Infiltration der Färbelösung in das pflanzliche Gewebe erfolgt durch Anlegen von Vakuum für 15 min. Die Blattproben werden mit der Färbelösung in Petrischalen so platziert, dass die Proben nicht austrocknen, jedoch Luftsauerstoff die Proben erreicht. Die so präparierten Proben werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wird das Pflanzenmaterial mit vorgewärmten Ethanol (96%, 65°C) versetzt und darin über mehrere Stunden inkubiert. Dieser Schritt zur Extraktion des Chlorophyll wird bis zur vollständigen Entfärbung mehrfach wiederholt.

5.2.5.4 ABA-Bestimmung in Pflanzenrohextrakten

Die Bestimmung der ABA-Konzentration in Rohextrakten aus *P. x canescens* und *A. thaliana* erfolgt durch das Phytodetek[®] ABA Test Kit (Agdia). Dieses Kit nutzt monoklonale Antikörper, die gegen ABA

gerichtet sind und ist im Bereich zwischen 0,0064 pmol bis 0,16 pmol ABA pro ml am sensitivsten. Das Prinzip der Messung mit dem Phytodetek® ABA Test Kit (Agdia) beruht auf einem kompetitiven ELISA. Die einzelnen Wells der ELISA-Platte sind bereits mit einem ABA-Antikörper beschichtet. Die einzelnen aufbereiteten Proben werden jeweils mit der identischen Konzentration ABA-Tracer versetzt. Die Detektion der ABA-Konzentration erfolgt über den ABA-Tracer, der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt ist und somit eine Farbreaktion erlaubt. ABA-Tracer und das ABA aus der Probe konkurrieren nun um eine limitierte Menge an ABA-Antikörpern. Bei hoher ABA-Konzentration im Rohextrakt kann weniger ABA-Tracer gebunden werden, somit fällt die Farbreaktion geringer aus. Eine starke Farbreaktion findet bei geringem ABA-Anteil statt, da mehr ABA-Tracer gebunden wird. Neben den Proben wird ein ABA-Standard mit bekannter ABA-Konzentration verwendet. Die photometrische Vermessung im ELISA-Reader nach Substratzugabe gibt Auskunft über den ABA-Gehalt der einzelnen Proben. Um die Messwerte des ELISA-Readers verwenden zu können, werden sie zunächst mit Hilfe der Standardwerte in %Binding-Werte umgerechnet. Aus diesen kann dann auf den ABA-Gehalt geschlossen werden. Die %Binding-Werte spiegeln den Prozentsatz an gebundenem ABA-Tracer wieder.

Für die ABA-Extraktion werden jeweils 100 mg Pflanzenmaterial eingesetzt und die ABA-Extraktion erfolgt in 700 µl sterilem ddH₂O über Nacht bei 4°C und unter leichtem Schwenken der Probe. Es wird zu jeder Probe eine Doppelbestimmung angefertigt. Da der vorhandenen Standard statt 0,1 µM ABA/ml nur 0,05 µM ABA/ml enthält, wird für die Standardreihe doppelt so viel Standard-Lösung eingesetzt. Für die Messung werden die *P. x canescens*-Proben nicht nur 1:4 mit TBS verdünnt, sondern es erfolgt noch eine zusätzliche 1:20-Verdünnung. Bei Vermessung von Trockenstressproben empfiehlt sich eine zusätzliche 1:40 (20% Gewichtsreduktion) bzw. eine 1:60-Verdünnung (40% Gewichtsreduktion). Statt erst die Probe und dann den ABA-Tracer getrennt in die Wells der Mikrotiterplatte zu geben, werden diese beiden Komponenten erst gemischt und so gleichzeitig in die Wells pipettiert. Ansonsten erfolgt die Durchführung des Kits nach Angaben des Herstellers.

5.2.5.5 cLSM-Mikroskopie

Bei Transformation von Pflanzenmaterial mit fluoreszierenden Reportergenen erfolgt die Auswertung mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 510 META (Zeiss, Göttingen, Deutschland).

Die GFP-bzw. YFP Expression wird unter Verwendung des Plan-Neofluar 20x/0,5 bzw. des C-Apochromat 40x/1,2 Wasserimmersions-Objektivs mikroskopisch analysiert. Für die GFP-Detektion und die Chlorophyll-Autofluoreszenz ist zur Anregung die Laserlinie 488 nm (Argon-Laser) erforderlich. Das Emissionslicht wird nach Passieren des HFT 488 über den Nebenfarbteiler NFT 545 aufgespalten und durch Auswahl des entsprechenden Bandpassfilters BP 505-550 nm weiter eingegrenzt. Die Chlorophyll-Autofluoreszenz wird im Meta-Kanal 665-697 nm aufgenommen. Zusätzlich wird das Hellfeldbild der Probe aufgezeichnet. Mit Hilfe des META-Detektors kann im Lambda-Modus zusätzlich die gesamte spektrale Signatur einer markierten Probe aufgenommen werden.

5.2.6 Anzucht von *P. x canescens*

5.2.6.1 Sterile *in-vitro*-Kultur

Sämtliche Arbeiten mit *in-vitro*-Pflanzen erfolgen an einer Faste-Sterilwerkbank (W. O. Schmidt, Braunschweig). Die Pflanzen werden in handelsüblichen 0,5 l-Weckgläsern auf modifiziertem MS-Medium kultiviert (Murashige and Skoog, 1962). Als Basalmedium wird das MS-Medium oder M $\frac{1}{2}$ -Medium verwendet. Im Unterschied zum Original-Medium wird beim M $\frac{1}{2}$ -Medium nur 50% der Makrosalzkonzentration sowie 20 g/l Saccharose eingesetzt. Außerdem enthält es 200 mg/l L-Glutamin und anstelle von MS-Vitaminen MW-Vitamine (Morel and Wetmore, 1951). Der pH-Wert des Mediums wird vor dem Autoklavieren mit 1 M KOH auf 5,8 eingestellt. Die Zugabe von L-Glutamin erfolgt nach dem Autoklavieren in das auf ca. 50°C abgekühlte Medium unter sterilen Bedingungen. Die Zusammensetzung der verschiedenen Medien ist im Anhang zu finden. Die Anzucht im *in-vitro*-Kulturraum erfolgt unter folgenden Bedingungen: 25°C bei 16 h Licht (150-200 μ E) und 8 h Dunkelheit. Zur Vermehrung werden Sprossspitzen und Seitenknospen mit einem ca. 2 cm langen Internodienstück verwendet, die nach acht bis zehn Tagen bewurzeln und sich in den anschließenden acht bis zehn Wochen zu etwa 8-12 cm großen Pflanzen entwickeln.

5.2.6.2 Überführung aus der *in-vitro*-Kultur in die Sandkultur

Einige Pappeln werden von *in-vitro*-Kulturen in Sandkulturen überführt. Für eine solche Sandkultur wird Quarzkristallsand (DORSILIT, Fa. Testra-Schäfer, Mannheim) in zwei verschiedenen Korngrößen (0,4-0,8 mm und 0,6-1,2 mm) im Mischungsverhältnis 1:1 verwendet. Die Pflanzen werden aus den *in-vitro*-Kulturen in Weckgläser mit Sand überführt (Schichthöhe: 2 cm) und gut mit Leitungswasser gewässert. Die Pappeln werden zur weiteren Anzucht in Wuchsschränke mit Tag/Nacht-Rhythmus (Tag: 7⁰⁰-17⁰⁰, Starklicht 2000 lx; 7³⁰-16³⁰, 25°C; Nacht: 22°C) gestellt. Zu Beginn der Sandkultur muss der Deckel des Weckglases verschlossen sein, um eine gesättigte H₂O-Atmosphäre zu schaffen. Der Deckel wird langsam immer weiter geöffnet, um die Pflanzen an geringere Luftfeuchtigkeit zu gewöhnen.

5.2.6.3 Hydroponik-Kultur

Pappel-Pflanzen können aus der Sandkultur in die hydroponische Kultur überführt werden. Für diese Kultivierungsform werden 3 l-Pflanztöpfe verwendet, die das Nährmedium enthalten und von einer durchbohrten Plastikplatte abgedeckt werden. In die Bohrungen dieser Platte werden die Pappel-Pflanzen am Übergang vom Wurzel- zum Sprossbereich eingesetzt, so dass die Pappelwurzeln Kontakt zum Medium aufnehmen. Vorbereitend zur Überführung der Pappeln in Hydroponik-Kultur wird der Sand aus dem Wurzelbereich mit Leitungswasser entfernt und der Übergangsbereich zwischen Spross und Wurzeln mit weichem Schaumstoff umgeben, so dass die kleinen Pflanzen nicht durch die Bohrung in den Plastikplatten rutschen. Die Hydroponik-Kultur der Pappeln wird in Pflanzenwuchsschränken mit folgender Tag/Nacht-Einstellung vorgenommen:

Tagesbeginn: 7⁰⁰ Uhr

Starklicht: 7³⁰-16³⁰ Uhr (2000 lx)

Tagesende: 17⁰⁰ Uhr

Die Temperatur war zwischen 25°C (Tag) und 22°C (Nacht) eingestellt.

5.2.7 Transformation von Pappel-Internodien

Für die Transformation von Pflanzenmaterial stehen verschiedene Methoden zur Auswahl. Mit Hilfe des Agrobakterien-vermittelten Gentransfers können beliebige DNA-Sequenzen, die sich zwischen den Border-Sequenzen einer T-DNA befinden, durch Infektion in pflanzliche Zellen übertragen werden. Das Fremdgen wird stabil in das Genom integriert. Diese Transformationsmethode wird routinemäßig zur Erzeugung von stabil transformierten Pappel-Linien genutzt (Leple et al., 1992).

Vorbereitung der Agrobakterien-Kultur

Die Agrobakterien-Klone werden auf CPY-Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen (Rifampicin, Gentamycin, Resistenz des Plasmides) und für 2 Tage bei 28°C inkubiert. Von einer frischen Selektionsplatte wird für die Transformation 30 ml CPY-Flüssigmedium (mit Antibiotika) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Diese Flüssigkultur wird über Nacht bei 28°C und 210 rpm kultiviert bis eine deutliche Trübung auftritt. In einen 100 ml Erlenmeyerkolben werden 25 ml MS-Flüssigmedium (ohne Antibiotika) vorgelegt und mit der Agrobakterien-Kultur versetzt bis die OD₆₆₀ den Wert 0,3 erreicht. Diese OD₆₆₀ entspricht einer Bakteriendichte von ca. 5×10^8 pro ml und hat sich als optimal erwiesen (Börstling, 1996).

Präinkubation und Infektion

Vor der Infektion werden Y-förmig eingeschnittene Internodienabschnitte der Pappel für ein bis zwei Tage bei 25°C im Dunkeln auf M1-Medium inkubiert. Diese Präinkubation adaptiert die Explantate für die nun folgende Infektion durch die Agrobakterien. Zur Infektion werden die Explantate in die vorbereitete Bakteriensuspension (OD₆₆₀ = 0,3) gegeben und darin für 16 h bei 28°C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 75 rpm inkubiert. Nach Abschluss der Infektion werden die Explantate auf sterilem Filterpapier kurz getrocknet. Die anschließende Co-Kultivierung erfolgt auf M1-Medium bei 28°C für zwei bis vier Tage im Dunkeln. Sie sollte beendet werden, wenn um die Explantate herum ein millimetergroßer Hof aus Bakterien auf dem Medium sichtbar ist.

Dekontamination

Um die Explantate oberflächlich von dem Bakterienrasen zu befreien, werden sie folgenden Waschschritten unterzogen:

4 × 5 min in sterilem Wasser

1 × 10 min in sterilem Wasser mit Cefotaxim (500 mg/l)

3 × 5 min in sterilem Wasser

Das Waschen erfolgt unter sterilen Bedingungen in 100 ml Erlenmeyerkolben bei mittlerer Schüttlergeschwindigkeit (ca. 280rpm).

Anschließend werden die Explantate auf sterilem Filterpapier kurz getrocknet, zur Kallusinduktion auf M2-Medium gelegt und bei 25°C im Dunkeln kultiviert.

Selektion und Regeneration

Nach etwa 20 Tagen wird der gebildete Kallus auf M3-Medium überführt, das zur Selektion das Antibiotikum der Pflanzenresistenz des eingebrachten Plasmids enthält. Die Petrischalen werden dann

den Standardlichtbedingungen von $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^2$ und einer 16/8 h Photoperiode ausgesetzt. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, werden die Kalli alle zehn auf neues M3-Medium umgesetzt. Die sich nach 9 bis 12 Monaten bildenden Sprosse werden bei einer Größe von 1 cm vom Kallus abgenommen und zur Bewurzelung auf M1/2-Medium ohne Antibiotika in Petrischalen überführt. Erst wenn die Sprosse Streckungswachstum zeigen und Anzeichen einer Wurzelbildung zu erkennen sind, werden sie in 0,5 l-Weckgläser mit M1/2-Medium umgesetzt. Nach einer Wachstumszeit von ungefähr sechs Wochen können diese Pflanzen physiologischen Untersuchungen unterzogen werden.

5.2.8 Stressapplikationen

5.2.8.1 Salzstress

Salzstress wurde mit *in-vitro*-Pflanzen durchgeführt. Die Pflanzen wuchsen dafür auf M1/2-Medium für ungefähr sechs Wochen ohne NaCl. Nach sechs Wochen wurde eine hochkonzentrierte NaCl-Lösung zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 50-200 mM im Medium vorlag. Zu Kontrolle wurde ddH₂O anstelle einer NaCl-Lösung zugefügt. Das zugegebene Volumen sollte dabei möglichst gering sein, da ansonsten die Flüssigkeit nicht vollständig in das Medium einziehen kann (bis 3 ml bei 72 ml Medium). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Pflanzen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend gemörsert.

5.2.8.2 Trockenstress

Die Trockenstressexperimente wurden mit abgetrennten Blättern von Pflanzen durchgeführt, die in hydroponischer Kultur gewachsen sind. Die Blätter wurden in Glaspetrischalen ($\varnothing=15$ cm) zu einem Frischgewichtsverlust getrocknet, der zwischen 20 und 40% lag. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Trocknungsstärken getestet. Für einen Verlust von 20% wurden die Pflanzen ungefähr 8 h und für 40% ca. 22 h getrocknet. Nach Erreichen des gewünschten Gewichtsverlust wurden die Blätter in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend gemörsert.

5.2.8.3 ABA-Applikation

Für die ABA-Besprühung wurden abgetrennte Blätter von Pflanzen verwendet, die in Hydroponik-Kultur gewachsen sind. Entweder wurden zwei gleichaltrige Blätter als Kontrolle und gestresstes Blatt verwendet oder Blatthälften desselben Blattes. Die Blattunterseite wurde dann mit der entsprechenden ABA-Konzentration besprüht (100, 200 und 400 μM). Beim Vergleich zweier Blatthälften wurde auf eine Blatthälfte ABA in den Konzentrationen von 100, 200 und 400 μM (ungefähr 5 ml) gesprüht und die andere wurde als Kontrolle verwendet. Beide Blatthälften wurden für verschiedene Zeiträume der Inkubation (1, 5, 24, 120 h) in Petrischalen ($\varnothing=15$ cm) mit feuchten Filterpapier inkubiert.

Die ABA-Applikation im Medium wurde mit *in-vitro*-Pflanzen durchgeführt. Die Pflanzen wuchsen dafür, wie auch im Salzstress, auf M1/2-Medium für ungefähr sechs Wochen ohne ABA. Nach sechs Wochen wurde eine konzentrierte ABA-Lösung zugegeben, so dass die gewünschte Endkonzentration im Medium vorlag. Zu Kontrolle wurde ddH₂O anstelle einer ABA-Lösung zugefügt.

6.0 Literaturverzeichnis

- Barabas, N.K., Omarov, R.T., Erdei, L., and Lips, H.S. (2000) Distribution of the Mo-enzymes aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in maize (*Zea mays* L.) nodal roots as affected by nitrogen and salinity. *Plant Science*, 155(1), 49-58.
- Berthold, S. (2009) Modulation der Moco-Sulfurase ABA3 in Pappel. Bachelorarbeit am Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig.
- Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res*, 12(22), 8711-8721.
- Bittner, F., Oreb, M., and Mendel, R.R. (2001) ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 276(44), 40381-40384.
- Börstling, D. (1996) Transformation von Zierpflanzen: Methoden und Anwendungen. Dissertation am Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.
- Bortels, H. (1930) Molybdenum as a catalyzer in biological nitrogen-fixation. *Arch Microbiol*, 1, 333-342.
- Bowler, C., and Fluhr, R. (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci*, 5(6), 241-246.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Bradshaw, H.D., Ceulemans, R., Davis, J., and Stettler, R. (2000) Emerging Model Systems in Plant Biology: Poplar (*Populus*) as A Model Forest Tree. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(3), 306-313.
- Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J. (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113-116.
- Chen, Z., and Gallie, D.R. (2004) The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*, 16(5), 1143-1162.
- Constabel, C.P., Yip, L., Patton, J.J., and Christopher, M.E. (2000) Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol*, 124(1), 285-295.
- Cutler, A.J., and Krochko, J.E. (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci*, 4(12), 472-478.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci*, 57(5), 779-795.
- De Renzo, E.C., Kaleita, E., Heyteler, P.G., Oleson, J.J., Hutchings, B.L., and Williams, J.H. (1953) Identification of the xanthine oxidase factor as molybdenum. *Arch Biochem Biophys*, 45, 247-253.
- Del Sal, G., Manfioletti, G., and Schneider, C. (1989) The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*, 7(5), 514-520.
- Deppe, L. (2008) Modulation des ABA-Gehaltes in Pappel. Bachelorarbeit am Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K., and Neill, S.J. (2001) Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol*, 126(4), 1579-1587.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(12), 7347-7351.
- Eilers, T., Schwarz, G., Brinkmann, H., Witt, C., Richter, T., Nieder, J., Koch, B., Hille, R., Hänsch, R., and Mendel, R.R. (2001) Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism. *J Biol Chem*, 276(50), 46989-46994.
- Elion, G.B., Callahan, S., Nathan, H., Bieber, S., Rundles, R.W., and Hichtchings, G.H. (1963) Potentiation by inhibition of drug degradation : 6-substituted purines and xanthine oxidase *Biochem Pharmacol*, 12(1), 85-93.
- Fedoroff, N.V. (2002) Cross-talk in abscisic acid signaling. *Sci STKE*, 2002(140), re10.
- Finkelstein, R.R., and Rock, C.D. (2002) Absciscic Acid Biosynthesis and Response. *The Arabidopsis Book*.

- Fricke, W., Akhiyarova, G., Wei, W., Alexandersson, E., Miller, A., Kjellbom, P.O., Richardson, A., Wojciechowski, T., Schreiber, L., Veselov, D., Kudoyarova, G., and Volkov, V. (2006) The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *J Exp Bot*, 57(5), 1079-1095.
- Gupta, U.C. (1997) Molybdenum in agriculture. Cambridge University Press.
- Hamisch, D. (2008) Untersuchungen zur Aktivität der Aldehydoxidase in Pappel. Bachelorarbeit am Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig.
- Hamisch, D. (2009) Transkriptionelle Regulation der Aldehydoxidase in transgenen Pappelpflanzen. Masterarbeit am Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4), 557-580.
- Hänsch, R., Lang, C., Riebeseel, E., Lindigkeit, R., Gessler, A., Rennenberg, H., and Mendel, R.R. (2006) Plant sulfite oxidase as novel producer of H₂O₂: combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step. *J Biol Chem*, 281(10), 6884-6888.
- Harley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A. (2000) DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research*, 10, 1788-1795.
- Heidenreich, T., Wollers, S., Mendel, R.R., and Bittner, F. (2005) Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *J Biol Chem*, 280(6), 4213-4218.
- Herrera-Medina, M.J., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Bote, J.A.O., and Garrido, J.M.G. (2007) Absciscic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 175, 554-564.
- Hesberg, C., Hänsch, R., Mendel, R.R., and Bittner, F. (2004) Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*: differential gene expression and enzyme activities. *J Biol Chem*, 279(14), 13547-13554.
- Hille, R. (1996) The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem Rev*, 96(7), 2757-2816.
- Hu, X., Zhang, A., Zhang, J., and Jiang, M. (2006) Absciscic Acid is a Key Inducer of Hydrogen Peroxide Production in Leaves of Maize Plants Exposed to Water Stress. *Plant Cell Physiol*, 47(11), 1484-1495.
- Huang, P.M., Chen, J.Y., and Wang, S.J. (2009) Tissue-specific regulation of rice molybdenum cofactor sulfurase gene in response to salt stress and ABA *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(3), 545-551.
- Ikegami, K., Okamoto, M., Seo, M., and Koshiba, T. (2009) Activation of absciscic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *J Plant Res*, 122(2), 235-243.
- International Poplar Commission: Report of the 22nd Session of the Commission and of the 42nd Session of its Executive Committee, Santiago, Chile, 28 November – 2 December 2004
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in absciscic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, 27(4), 325-333.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2000) A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in absciscic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol*, 123(2), 553-562.
- Jansson, S., and Douglas, C.J. (2007) *Populus*: a model system for plant biology. *Annu Rev Plant Biol*, 58, 435-458.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 6(13), 3901-3907.
- Johnson, J.L., Hainline, B.E., and Rajagopalan, K.V. (1980) Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase, and nitrate reductase. Identification of a pteridine as a structural component. *J Biol Chem*, 255, 1783-1786.
- Johnson, J.L., and Rajagopalan, K.V. (1982) Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(22), 6856-6860.
- Kende, H., and Zeevaart, J. (1997) The Five "Classical" Plant Hormones. *Plant Cell*, 9(7), 1197-1210.
- Ketchum, P.A., Cambier, H.Y., Frazier, W.A., 3rd, Madansky, C.H., and Nason, A. (1970) In vitro assembly of *Neurospora* assimilatory nitrate reductase from protein subunits of a *Neurospora* mutant and the xanthine oxidizing or aldehyde oxidase systems of higher animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 66(3), 1016-1023.
- Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T., and Koshiba, T. (2004) Tissue-specific localization of an absciscic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 134(4), 1697-1707.

- Koncz, C., and Schell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics MGG*, 204(3), 383-396.
- Koshiba, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N., and Sato, M. (1996) Purification and Properties of Flavin- and Molybdenum-Containing Aldehyde Oxidase from Coleoptiles of Maize. *Plant Physiol*, 110(3), 781-789.
- Kuchernig, J.C. (2007) Regulation von Molybdoenzymen in Pappel. Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig.
- Kuper, J., Llamas, A., Hecht, H.J., Mendel, R.R., and Schwarz, G. (2004) Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature*, 430(7001), 803-806.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lang, C., Popko, J., Wirtz, M., Hell, R., Herschbach, C., Kreuzwieser, J., Rennenberg, H., Mendel, R.R., and Hänsch, R. (2007) Sulphite oxidase as key enzyme for protecting plants against sulphur dioxide. *Plant Cell Environ*, 30(4), 447-455.
- Lau, U. (2009) Regulation der Aldehydoxidase in Pappel (im jahreszeitlichen Verlauf und unter Stress). Bachelorarbeit am Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig.
- Lei, Y., Yin, C., and Li, C. (2007) Adaptive responses of *Populus przewalskii* to drought stress and SNP application. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(6), 519-526.
- Leon-Kloosterziel, K.M., Gil, M.A., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A., and Koornneef, M. (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J*, 10(4), 655-661.
- Leple, J.C., Brasileiro, A.C.M., Michel, M.F., Delmotte, F., and Jouanin, L. (1992) Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports*, 11(3), 137-141.
- Leydecker, M.T., Moureaux, T., Kraepiel, Y., Schnorr, K., and Caboche, M. (1995) Molybdenum Cofactor Mutants, Specifically Impaired in Xanthine Dehydrogenase Activity and Absciscic Acid Biosynthesis, Simultaneously Overexpress Nitrate Reductase. *Plant Physiol*, 107(4), 1427-1431.
- Liu, Z., and Dickmann, D.I. (1992) Responses of two hybrid *Populus* clones to flooding, drought, and nitrogen availability. I: Morphology and growth. *Canadian journal of botany*, 70(11), 2265-2270.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E. (2009) Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Absciscic Acid Sensors. *Science*, 324(5930), 1064-1068.
- Mahler, H.R., Mackler, B., and Green, D.E. (1954) Studies on metalloflavoproteins. III. Aldehyde oxidase: a molybdoflavoprotein. *J Biol Chem*, 210(1), 465-480.
- Melhorn, V., Matsumi, K., Koiwai, H., Ikegami, K., Okamoto, M., Nambara, E., Bittner, F., and Koshiba, T. (2008) Transient expression of AtNCED3 and AAO3 genes in guard cells causes stomatal closure in *Vicia faba*. *J Plant Res*, 121, 125-131.
- Mendel, R.R. (1992) The plant molybdenum cofactor (MoCo)- its biochemical and molecular genetics. *Plant Biotechnology and Development-Current Topics in Plant Molecular Biology*, 11-16.
- Mendel, R.R. (1997) Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. *Planta*, 203(4), 399-405.
- Mendel, R.R. (2007) Biology of the molybdenum cofactor. *J Exp Bot*, 58(9), 2289-2296.
- Mendel, R.R., and Schwarz, G. (1999) Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 18, 33-69.
- Mendel, R.R., and Schwarz, G. (2002) Biosynthesis and molecular biology of the molybdenum cofactor (Moco). Metal ions in biological systems, molybdenum and tungsten. Their roles in biological processes., 317-368.
- Meyer, S. (2003) Untersuchungen zur Regulation der Nitratreduktase in Pappel und Inaktivierung mittels RNAi. Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig.
- Meyer, S., Nowak, K., Sharma, V.K., Schulze, J., Mendel, R.R., and Hänsch, R. (2004) Vectors for RNAi technology in poplar. *Plant Biol (Stuttg)*, 6(1), 100-103.
- Morel, G., and Wetmore, R.H. (1951) Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany*, 38(2), 138-140.
- Müller, A.J., and Mendel, R.R. (1989) Biochemical and somatic cell genetics of nitrate reduction in *Nicotiana*. Oxford University Press, 166-185.
- Munns, R., and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 651-681.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.

- Nambara, E., and Marion-Poll, A. (2005) Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol*, 56, 165-185.
- Nason, A., Antoine, A.D., Ketchum, P.A., Frazier, W.A., 3rd, and Lee, D.K. (1970) Formation of assimilatory nitrate reductase by in vitro inter-cistronic complementation in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 65(1), 137-144.
- Nicholas, D.J., and Nason, A. (1954) Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase. *J Biol Chem*, 207(1), 353-360.
- Nowak, K., Luniak, N., Witt, C., Wustefeld, Y., Wachter, A., Mendel, R.R., and Hänsch, R. (2004) Peroxisomal localization of sulfite oxidase separates it from chloroplast-based sulfur assimilation. *Plant Cell Physiol*, 45(12), 1889-1894.
- Oelkers, M. (2007) Molybdoenzyme in Pappel: Regulation und Modifikation mittels RNAi. Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig.
- Ohkuma, K., Lyon, J.L., Addicott, F.T., and Smith, O.E. (1963) Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science*, 142(3599), 1592-1593.
- Okamoto, K., Eger, B.T., Nishino, T., Kondo, S., and Pai, E.F. (2003) An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. *J Biol Chem*, 278(3), 1848-1855.
- Omarov, R., Akaba, S., Koshiba, T., and Lips, S. (1999) Aldehyde oxidase in roots, leaves and seeds of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot*, 50(330), 63-69.
- Omarov, R., Sagi, M., and Lips, H.S. (1998) Regulation of aldehyde oxidase and nitrate reductase in roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) by nitrogen source and salinity. *J Exp Bot*, 49(322), 897-902.
- Park, H.Y., Seok, H.Y., Park, B.K., Kim, S.H., Goh, C.H., Lee, B.H., Lee, C.H., and Moon, Y.H. (2008) Overexpression of Arabidopsis ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 375(1), 80-85.
- Pateman, J.A., Cove, D.J., Rever, B.M., and Roberts, D.B. (1964) A Common Co-Factor for Nitrate Reductase and Xanthine Dehydrogenase Which Also Regulates the Synthesis of Nitrate Reductase. *Nature*, 201, 58-60.
- Phillips, J., Artsaenko, O., Fiedler, U., Horstmann, C., Mock, H.P., Muntz, K., and Conrad, U. (1997) Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *EMBO J*, 16(15), 4489-4496.
- Pierce, M., and Raschke, K. (1981) Synthesis and metabolism of abscisic acid in detached leaves of *Phaseolus vulgaris* L. after loss and recovery of turgor. *Planta*, 153(2), 156-165.
- Popko, J., Hänsch, R., Mendel, R.R., Polle, A., and Teichmann, T. (in press) The Role of Absciscic Acid an Auxin in the Response of Poplar to Abiotic Stress. *Plant Biol* (Stuttg).
- Qin, X., and Zeevaart, J.A. (2002) Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol*, 128(2), 544-551.
- Rajagopalan, K.V. (1996) Biosynthesis of the molybdenum cofactor. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, 674-679
- Ratke, C. (2006) Untersuchungen zur *in vivo* Interaktion von Proteinen des Molybdän-Stoffwechsels. Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig.
- Rock, C.D., Heath, T.G., Gage, D.A., and Zeevaart, J.A. (1991) Absciscic Alcohol Is an Intermediate in Absciscic Acid Biosynthesis in a Shunt Pathway from Absciscic Aldehyde. *Plant Physiol*, 97(2), 670-676.
- Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J., Bhalerao, R.P., Boerjan, W., and Rohde, A. (2007) A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *Plant Cell*, 19(8), 2370-2390.
- Sagi, M., Scazzocchio, C., and Fluhr, R. (2002) The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants. *Plant J*, 31(3), 305-317.
- Samuel, D., Kumar, T.K., Ganesh, G., Jayaraman, G., Yang, P.W., Chang, M.M., Trivedi, V.D., Wang, S.L., Hwang, K.C., Chang, D.K., and Yu, C. (2000) Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci*, 9(2), 344-352.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467.
- Sauer, P., Frebortova, J., Sebela, M., Galuszka, P., Jacobsen, S., Pec, P., and Frebort, I. (2002) Xanthine dehydrogenase of pea seedlings: a member of the plant molybdenum oxidoreductase family. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 393 - 400.
- Schindelin, H., Kisker, C., Hilton, J., Rajagopalan, K.V., and Rees, D.C. (1996) Crystal structure of DMSO reductase: redox-linked changes in molybdopterin coordination. *Science*, 272(5268), 1615-1621.

- Schwartz, S.H., Leon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., and Zeevaart, J.A. (1997) Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 114(1), 161-166.
- Schwarz, G., and Mendel, R.R. (2006) Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 623-647.
- Schwarz, G., Mendel, R.R., and Ribbe, M.W. (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature*, 460(7257), 839-847.
- Seo, M., Akaba, S., Oritani, T., Delarue, M., Bellini, C., Caboche, M., and Koshiba, T. (1998) Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 116(2), 687-693.
- Seo, M., Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y., and Koshiba, T. (2000a) Absciscic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 23(4), 481-488.
- Seo, M., and Koshiba, T. (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci*, 7(1), 41-48.
- Seo, M., Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A., Koornneef, M., Kamiya, Y., and Koshiba, T. (2000b) The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(23), 12908-12913.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol*, 115(2), 327-334.
- Tan, B.C., Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L., Li, Q.B., Cline, K., and McCarty, D.R. (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J*, 35(1), 44-56.
- Taylor, G. (2002) *Populus*: arabidopsis for forestry. Do we need a model tree? *Ann Bot*, 90(6), 681-689.
- Taylor, I.B., Burbidge, A., and Thompson, A.J. (2000) Control of abscisic acid synthesis. *J Exp Bot*, 51(350), 1563-1574.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Parker, R.A., Morpeth, D.R., Burbidge, A., and Taylor, I.B. (2000) Absciscic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 42(6), 833-845.
- Töpfer, R., Schell, J., and Steinbiss, H.H. (1988) Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. *Nucleic Acids Res*, 16(17), 8725.
- Triplett, E.W., Blevins, D.G., and Randall, D.D. (1980) Allantoic Acid Synthesis in Soybean Root Nodule Cytosol via Xanthine Dehydrogenase. *Plant Physiol*, 65(6), 1203-1206.
- Türkan, I., and Demiral, T. (2009) Recent developments in understanding salinity tolerance *Environ Exp Bot*, 67, 2-9.
- Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.L., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroove, S., Dejardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J.C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.J., Uberbacher, E., Unneberg, P., et al. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313(5793), 1596-1604.
- Uknes, S.J., and Ho, T.H. (1984) Mode of Action of Absciscic Acid in Barley Aleurone Layers : Absciscic Acid Induces Its Own Conversion to Phaseic Acid. *Plant Physiol*, 75(4), 1126-1132.
- Unold, P. (2010) Physiologische Untersuchungen zur Anpassung von Pappel an Salz- und Trockenstress. Bachelorarbeit am Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig.
- Westerfeld, W.W., and Richter, D.A. (1949) A new dietary factor related to xanthine oxidase. *Science*, 109(68).

- Wollers, S., Heidenreich, T., Zarepour, M., Zachmann, D., Kraft, C., Zhao, Y., Mendel, R.R., and Bittner, F. (2008) Binding of sulfurated molybdenum cofactor to the C-terminal domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *J Biol Chem*, 283(15), 9642-9650.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., and Zhu, J.K. (2001) The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell*, 13(9), 2063-2083.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., and Zhu, J.K. (2002) Regulation of Osmotic Stress-responsive Gene Expression by the LOS6/ABA1 Locus in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 277, 8588-8596.
- Xiong, L., and Zhu, J.K. (2003) Regulation of Abscissic Acid Biosynthesis. *Plant Physiol*, 133, 29-36.
- Yang, X., Kalluri, U., Difazio, S., Wulschleger, S.D., Tschaplinski, T.J., Cheng, M.Z., and Tuskan, G.A. (2009) Poplar Genomics: State of the Science. *Critical Review in Plant Sciences*, 28, 285-308.
- Zdunek-Zastocka, E., and Lips, H.S. (2003a) Is xanthine dehydrogenase involved in response of pea plants (*Pisum sativum* L.) to salinity or ammonium treatment? . *Acta Physiologiae Plantarum*, 25(4), 395-401.
- Zdunek-Zastocka, E., and Lips, H.S. (2003b) Tissue-specific regulation of rice molybdenum cofactor sulfurase gene in response to salt stress and ABA *Acta Physiologiae Plantarum*, 25(4), 437-452.
- Zdunek-Zastocka, E., Omarov, R.T., Koshiba, T., and Lips, H.S. (2004) Activity and protein level of AO isoforms in pea plants (*Pisum sativum* L.) during vegetative development and in response to stress conditions. *J Exp Bot*, 55(401), 1361-1369.
- Zhu, C., Schraut, D., Hartung, W., and Schaffner, A.R. (2005) Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *J Exp Bot*, 56(421), 2971-2981.
- Zhu, J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 247-273.

7.0 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf-R. Mendel für die Vergabe eines spannenden und vielseitigen Themas, die Möglichkeit der Durchführung der zahlreichen interessanten und mannigfaltigen Experimente in seinem Forschungslabor. Sein stetiges Interesse und die ständige Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Fortschritt meiner Arbeit beigetragen. Ich konnte mir seiner Unterstützung immer gewiss sein.

Mein ganz besonderer und lieber Dank gilt meinem Mentor PD Dr. Robert Hänsch. Er hat mich über die Jahre immer fachkundig und freundschaftlich betreut. Seine aufmunternden Worte, unermüdliche Motivation und unablässiges Interesse waren mir immer eine große Hilfe. Seine Ratschläge und Denkanstöße haben erheblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Jörg Fromm danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich für die Bereitschaft, den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Dr. Florian Bittner bedanken. Seine Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Ratschläge haben mir sehr geholfen. Vielen Dank auch für die Bereitstellung von Konstrukten und Antikörpern. Bei Frau Dr. Jutta Schulze möchte ich mich besonders für ihre Unterstützung im Laboralltag, ihre Diskussionsbereitschaft und ihr ständiges Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Pflanzenbiologie für die sehr angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre. Marion Kay, Daniela Misch und Juliane Siebert danke ich für ihre helfenden Hände im Labor. Für den wissenschaftlichen Beitrag zu dieser Arbeit und die freundschaftliche Zusammenarbeit möchte ich mich ganz besonders bei Margit Oelkers, Domenica Hamisch, Lisa Deppe, Steffen Berthold, Ulrike Lau, Philipp Unold und Sonja Jäger bedanken. Ein Riesendankeschön geht an Christina Lang und Christian Gehl für die tolle Zusammenarbeit und jegliche Unterstützung, derer ich mir immer sicher sein konnte. Den zahlreichen Praktikanten und Bachelor-/Master-Studenten danke ich für den schönen Laboralltag und die stetige Hilfe, insbesondere Carolin Mahler, Janine Strehmel und Vera Obarowski. Mir werden die Pausen wirklich fehlen und ich werde euch sehr vermissen.

Dr. Robert Geffers möchte ich für die Durchführung der Microarrays und seine große Hilfe bei der Auswertung danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Auch bei der Pappelforschergruppe, insbesondere bei Prof. Dr. Andrea Polle, Dr. Thomas Teichmann, Prof. Dr. Jörg Fromm und Dr. Silke Lautner, möchte ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz lieber Dank geht an meine Freunde, von denen ich viele im Labor kennengelernt habe. Sie haben mich immer unterstützt und waren, besonders in schwierigen Zeiten, immer für mich da.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern Ingrid und Dieter Popko bedanken, die mich in jeder Lebenslage unterstützen und ermutigen, meinen Weg zu gehen, und immer für mich da sind. Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

8.0 Lebenslauf

Angaben zur Person:

Nachname:	Popko
Vorname	Jennifer
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum:	22.11.1982
Geburtsort:	Peine
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

1989 – 1991	Grundschule Oberg
1991 – 1993	Grund – und Hauptschule Lengede
1993 – 1995	Orientierungsstufe Lengede
1995 – 2002	Gymnasium Groß Ilsede
Juni 2002	Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

Studium

01.10.2002	Beginn des Studiums der Technischen Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig, Studiengang „Biologie“ (Diplom)
13.04.2006-13.12.2006	Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ralf-R. Mendel. Thema: „Die Bedeutung der Sulfitoxidase für den Redoxstatus in pflanzlichen Geweben“. Note: „Sehr gut“
22.03.2007	Abschluss zur Diplom-Biologin

Promotion

15.01.2007-(05.02.2010)	Promotion am Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf-R. Mendel Thema: „Genetische Modulation der ABA-vermittelten Stressantwort in der Gattung Populus“
-------------------------	--

Allgemeine Veröffentlichungen

Lang C, Popko J, Witz M, Hell R, Herschbach C, Kreuzwieser J, Rennenberg H, Mendel RR, Hänsch R (2007). Sulphite oxidase as key enzyme for protecting plants against sulphur dioxide. Plant Cell Environ. 30, 447-455